

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

**Le rôle de la protéine TMEM45A dans la protection conférée par l'hypoxie contre l'effet des chimiothérapies anti-cancéreuses dans les cellules de carcinome rénal**

Chen, Jia-Wei

*Award date:*  
2018

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.





**Faculté des Sciences**

**LE ROLE DE LA PROTEINE TMEM45A DANS LA PROTECTION CONFERE  
PAR L'HYPONIE CONTRE L'EFFET DES CHIMIOETHERAPIES  
ANTI-CANCEREUSES DANS LES CELLULES DE CARCINOME RENAL**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Jia-Wei CHEN

Janvier 2018



**Université de Namur**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

## **Le rôle de la protéine TMEM45A dans la protection conférée par l'hypoxie contre l'effet des chimiothérapies anti-cancéreuses dans les cellules de carcinome rénal**

CHEN Jia-Wei

### Résumé

L'hypoxie tumorale est souvent associée à la chimiorésistance des cellules cancéreuses et à un mauvais pronostic pour les patients. Les adaptations cellulaires mis en place dans ces conditions ne sont pas encore claires, mais le facteur 1 inductible par l'hypoxie (HIF-1) est connu pour jouer un rôle majeur dans l'adaptation à l'hypoxie des cellules cancéreuses. Des études récentes visant à étudier les mécanismes sous-jacents ont permis d'identifier plusieurs gènes, parmi lesquels se trouve *TMEM45A*. *TMEM45A* est un gène de cible HIF-1 codant pour une protéine transmembranaire associée à l'appareil de Golgi. Très peu de données sont disponibles sur cette protéine mais son implication dans la protection conférée par l'hypoxie face aux agents chimiothérapeutiques a déjà été mise en évidence dans les cancers du sein et du foie. De plus, une corrélation entre *TMEM45A* et la sévérité du carcinome à cellules rénales (RCC) a également été rapportée. Dans cette étude, afin d'investiguer le rôle de *TMEM45A* dans la protection conférée par l'hypoxie contre l'effet des agents chimiothérapeutiques dans le RCC, son expression a été invalidée dans des cellules de RCC4 par deux stratégies. Les résultats ont permis de confirmer la surexpression de *TMEM45A* en condition d'hypoxie dans ce modèle, de valider la localisation subcellulaire de la protéine et de mettre en évidence une protection face à l'agent chimiothérapeutique en hypoxie. Ils ont également montré une invalidation efficace mais non totale de *TMEM45A* dans des cellules transduites exprimant le shARN (short hairpin RNA) ciblant l'ARNm de *TMEM45A*. Les cellules invalidées présentaient un taux de prolifération plus faible que les cellules contrôles mais, de façon inattendue, montraient également une sensibilité plus faible à l'apoptose induite par le cisplatine. Des expériences supplémentaires effectuées dans le but d'investiguer les mécanismes potentiels sous-jacents ont montré qu'un traitement au cisplatine induirait une activation différentielle de l'UPR suite à l'invalidation de *TMEM45A*. Dans un second temps, l'expression de *TMEM45A* a été invalidée par une autre technique : le système CRISPR-Cas9. Des analyses de fragments ont permis de confirmer cette nouvelle méthode d'invalidation malgré le faible nombre de mutants générés. Cependant, les effets phénotypiques observés au niveau de la prolifération et de la morphologie de certains clones ne semblent pas liés à une mutation de *TMEM45A*. L'ensemble des résultats témoigne de l'implication de *TMEM45A* dans la chimiosensibilisation au cisplatine des cellules issues du RCC, suggérant son rôle dual dans la chimiosensibilité des cellules cancéreuses face aux agents chimiothérapeutiques.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2018

**Promoteur:** C. Michiels



## Remerciements

---

Après une année passée au sein de l'URBC, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères à plusieurs personnes, sans qui cette année de mémoire n'aurait pas été la même.

Je tiens tout d'abord à remercier ma promotrice, Carine Michiels, de m'avoir acceptée dans son équipe pour ce mémoire. Merci pour votre disponibilité, votre aide précieuse, vos conseils avisés, vos corrections rigoureuses (et si rapides !) et votre bonne humeur. Vous avez toujours les mots pour nous encourager et nous motiver afin qu'on donne le meilleur de nous-mêmes.

Je tiens ensuite à remercier Kathleen pour m'avoir si bien formée tout au long de l'année. Tu m'as initiée à la recherche d'une main de maître ! Tu es une encadrante formidable et sans toi, je ne serais pas parvenue au bout de ce mémoire. Merci pour ta patience, ton écoute et tes conseils dans les bons moments comme dans les moments de doute. Merci d'avoir été si disponible et de m'avoir consacrée autant de temps. J'espère qu'après ce mémoire, ma petite voix dans ta tête continuera à faire « Coucou Kathleen ! Kathleeeen ? Dis Kathleen ? Hé Kathleen ! ». Bref, merci pour tout !

J'aimerais remercier aussi tous les membres de l'équipe TumHyp pour votre aide et votre bonne humeur au quotidien. Votre spontanéité et vos blagues ont fait en sorte que je me sente rapidement bien intégrée au sein de l'équipe. Vous avez su rendre les réunions d'équipe drôles et agréables (surtout avec les petits goûters). Vous êtes une équipe au top !

Je remercie également tous les techniciens du laboratoire, toujours prêts à accourir au moindre souci ou à donner un coup de main. Merci Maude, Antoine, Guy, Martine, Noëlle, Catherine pour l'aide apportée tout le long de l'année.

Merci également à tous les autres membres de l'URBC qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire et au bon déroulement de cette année.

Je n'oublie pas mes collègues de bureau : An, Alison et Clotilde. Les papotes, délires, bouffes et jeux au bureau vont me manquer. Merci pour tous les moments et fous rires partagés ensemble. Merci également aux collègues d'en face : Mathilde, Marie-Albane, Amélie et Jérémy. Vous avez tous rendu cette année haute en couleur et je suis heureuse d'avoir vécu cette aventure à vos côtés. On en sera venu à bout de ce mémoire, on peut être fiers de nous !

Je tiens enfin à remercier ma famille pour leur soutien non seulement cette année, mais depuis le début de mes études. Je remercie aussi mes amis pour leurs encouragements qui m'ont fait chaud au cœur. Merci aussi à Louis, d'être toujours présent à mes côtés à chaque épreuve.

Du fond du cœur, merci !

*avec un immense amour*

Jia-Wei



## Abréviations

---

5-FU	5-Fluorouracil
7-AAD	7-aminoactinomycine D
ABC	ATP-binding cassette
AMPK	AMP activated protein kinase
ARNcr	ARN CRISPR
ARNg	ARN guide
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ARNtracr	ARN CRISPR transactivateur
ATF6 $\alpha$	Activating transcription factor 6
BCL-2	B cell lymphoma 2
BrdU	Bromodésoxyuridine
BCPR	Breast cancer resistance protein
bHLH-PAS	Basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM
BIP	Binding immunoglobulin protein
BSA	Bovine serum albumin
ccRCC	RCC à cellules claires
Cdk1	Cyclin dependent kinase 1
chRCC	RCC chromophile
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRISPR-	Clustered regular interspaced short palindromic repeats –
Cas9	CRISPR associated protein 9
Ct	Cycle threshold
CXR	Carboxy-X-rhodamine
DDR	DNA damage response
DERP7	Dermal papilla-derived protein 7
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNAPTP4	DNA polymerase-transactivated protein 4
DTT	Dithiothreitol
eIF2 $\alpha$	Eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$
EPO	Erythropoïétine
ERAD	ER-associated protein degradation
FITC	Isothioacyanate de fluorescéine
GAPDH	Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GRP78	78 kDa Glucose-regulated protein
HIF	Hypoxia inducible factor
hPGK	Phosphoglycérate kinase humaine
HR	Homologous repair
HRE	Hypoxia response element
HSP5	Heat shock protein 5
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IGF	Insulin-like growth factor
Indels	Insertion/délétion
IRE1 $\alpha$	Inositol-requiring protein 1 $\alpha$
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KO	Knock out
LDH	Lactate déshydrogénase
LDS	Lithium dodecyl sulfate



## Abréviations

---

MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDR1	Multi-drug resistance protein 1
miARN	Micro-ARN
MMR	Mismatch repair
MOI	Multiplicity of infection
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NHEJ	Non homologous end joining
PAM	Protospacer adjacent motif
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymérase
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PERK	PRKR ER kinase
PFA	Paraformaldéhyde
PFK	Phosphofructokinase
PGK1	Phosphoglycérate kinase 1
PHD	Prolyl hydroxylase
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PKM	Pyruvate kinase M
PolDIP2	Polymerase delta interacting protein 2
PPT	Passage post-transduction
pRCC	RCC papillaire
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RCC	Carcinome à cellules rénales
RE	Réticulum endoplasmique
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA-seq	RNA-sequencing
ROS	Reactive oxygen species
RT-qPCR	Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodécyl sulfate
shARN	Short hairpin RNA
siARN	Small interfering RNA
TDDM1	Transmembrane epididymal protein 1
TDM	Tomodensitométrie
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
UPR	Unfolded protein response
UQCR10	Ubiquitinol-cytochrome c reductase 10
uRCC	RCC non classifiés
UT	Non transduit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VHL	Von Hippel-Lindau
XBP1	X-box binding protein 1



<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>2</b>
<b>1 Le cancer rénal</b>	<b>3</b>
1.1 Anatomie et fonctions du rein	3
1.2 Classification et caractéristiques des cancers rénaux	3
1.2.1 Les carcinomes à cellules rénales	3
1.2.2 Les carcinomes du tractus urinaire supérieur	4
1.2.3 Les néphroblastomes chez l'enfant	4
1.3 Incidence, facteurs de risque et symptômes cliniques	4
1.4 Diagnostic et traitements	5
<b>2 Les agents chimiothérapeutiques dans le cancer</b>	<b>5</b>
2.1 Agents chimiothérapeutiques et leurs mécanismes d'action	5
2.1.1 Les agents alkylants	6
2.1.2 Les anti-mitotiques	6
2.1.3 Les inhibiteurs de topoïsomérases	7
2.1.4 Les inhibiteurs de tyrosine kinases	7
2.1.5 Les anti-métabolites	8
2.1.6 Les antibiotiques anti-tumoraux	8
2.2 Agents chimiothérapeutiques utilisés dans les RCC	8
2.3 Mécanismes de résistance des cellules cancéreuses face aux agents chimiothérapeutiques	9
2.3.1 Les pompes à efflux	9
2.3.2 L'inactivation de drogue	9
2.3.3 L'altération de cible	9
2.3.4 La réparation des dommages à l'ADN	10
2.3.5 L'inhibition de l'apoptose et la survie cellulaire	10
2.3.5.1 Surexpression des protéines anti-apoptotiques	10
2.3.5.2 Diminution de l'expression de gènes pro-apoptotiques	11
2.3.5.3 Altérations de p53	11
2.3.5.4 Altérations de la voie PI3K/Akt	11
2.3.5.5 L'autophagie	12
2.3.5.6 Altérations de la voie UPR	12
2.3.6 Le microenvironnement tumoral	13
<b>3 Hypoxie et résistance aux agents anti-cancéreux</b>	<b>14</b>
3.1 Hypoxie tumorale	14
3.2 HIF-1	14
3.2.1 Caractéristiques et structure	14
3.2.2 Régulation de HIF-1	15
3.2.3 Cibles de HIF-1	16
3.2.4 Mutation de pVHL dans les ccRCC	17
<b>4 TMEM45A</b>	<b>17</b>
4.1 Caractéristiques de TMEM45A	17
4.2 TMEM45A et les cancers	18
<b>5 Objectifs du mémoire</b>	<b>20</b>
<b>II. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>21</b>
<b>1 Culture cellulaire</b>	<b>22</b>
1.1 Modèle cellulaire utilisé	22
1.2 Repiquage des cellules	22
<b>2 Incubation en hypoxie</b>	<b>22</b>
<b>3 Transduction lentivirale</b>	<b>23</b>
3.1 Principe	23
3.2 Méthode	23



## Table des matières

<b>4</b>	<b>Extraction d'ARN total et RT-qPCR</b>	<b>23</b>
4.1	Principe	23
4.2	Méthode	24
4.2.1	Extraction d'ARN total	24
4.2.2	Rétro-transcription de l'ARNm en ADNc	24
4.2.3	PCR en temps réel	24
<b>5</b>	<b>Comptage cellulaire</b>	<b>25</b>
5.1	Méthode	25
<b>6</b>	<b>Marquage au BrdU et cytométrie en flux (FACS)</b>	<b>25</b>
6.1	Principe	25
6.2	Méthode	25
<b>7</b>	<b>Marquage en immunofluorescence</b>	<b>26</b>
7.1	Principe	26
7.2	Méthode	26
<b>8</b>	<b>Test MTT</b>	<b>27</b>
8.1	Principe	27
8.2	Méthode	27
<b>9</b>	<b>Test LDH</b>	<b>27</b>
9.1	Principe	27
9.2	Méthode	27
<b>10</b>	<b>Extraction protéique et Western Blot</b>	<b>28</b>
10.1	Principe	28
10.2	Méthode	28
10.2.1	Extraction protéique	28
10.2.2	Dosage de la concentration en protéines	28
10.2.3	Préparation des gels de polyacrylamide	29
10.2.4	Électrophorèse	29
10.2.5	Transfert sur membrane	29
10.2.6	Traitement des membranes et révélation	30
<b>11</b>	<b>Technique de CRISPR-Cas9</b>	<b>30</b>
11.1	Principe	30
11.2	Méthode	30
11.2.1	Production de particules lentivirales	30
11.2.2	Transduction des cellules RCC4 plus pVHL	31
11.2.3	Dilution limite et amplification clonale	31
<b>12</b>	<b>Extraction d'ADN et analyse de fragments</b>	<b>31</b>
12.1	Principe	31
12.1.1	Extraction d'ADN	31
12.1.2	Amplification par PCR	32
12.1.3	Analyse de fragments	32
<b>III</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>33</b>
<b>1</b>	<b>Modèle d'étude</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>Invalidation de TMEM45A par la technique des shARN</b>	<b>34</b>
2.1	Analyse des expressions génique et protéique de TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A	35
2.2	Caractérisation des cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A	36
2.3	Analyse de la sensibilité au cisplatine des cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A	37
2.4	Identification de mécanismes potentiels impliquant TMEM45A dans la réponse des cellules RCC4 plus pVHL au cisplatine	38
<b>3</b>	<b>Invalidation de TMEM45A par le système de CRISPR-Cas9</b>	<b>39</b>
3.1	Analyse de la morphologie des clones CRISPR-Cas9	40
3.2	Analyse de l'invalidation de TMEM45A par le système CRISPR-Cas9	41



## Table des matières

---

<b>IV. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION</b>	<b>42</b>
Discussion et perspectives .....	43
Conclusion générale.....	49
<b>V. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>50</b>
<b>VI. ANNEXES</b>	<b>58</b>

---

Le cancer constitue la deuxième cause de mortalité dans le monde après les maladies cardiovasculaires. En 2015, le cancer a provoqué près de 9 millions de morts, soit un décès sur 6 est lié à cette maladie. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70 % environ au cours des deux prochaines décennies. Toutes ces données font du cancer un des problèmes majeurs de santé publique dans le monde entier.

Comme décrit par Hanahan et Weinberg, le phénotype des cellules cancéreuses est une manifestation de six altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance maligne. Ces altérations sont l'autosuffisance aux signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance, l'évasion à la mort cellulaire programmée, le potentiel réplicatif illimité, l'angiogenèse soutenue et l'invasion tissulaire par les métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). Elles ont par la suite été complétées par deux nouvelles capacités fonctionnelles des cellules cancéreuses qui sont la reprogrammation métabolique et l'échappement au système immunitaire. Deux facteurs favorisant leur pathogénicité ont également été rajoutés : l'instabilité génomique et l'environnement inflammatoire (Hanahan and Weinberg, 2011). La transition de cellules normales à cellules malignes se fait par l'acquisition successive de ces caractéristiques via des altérations génétiques ou épigénétiques. L'évolution de la maladie est donc un processus en plusieurs étapes au cours desquelles chacun de ces changements physiologiques permet aux cellules cancéreuses de proliférer, de survivre et de se disséminer dans les tissus sains.

Parmi les facteurs de risque du développement d'un cancer, les principaux sont le tabagisme, la consommation d'alcool, une mauvaise alimentation, la sédentarité, la pollution et les UV. En évitant ces facteurs de risque, il serait donc possible de réduire considérablement l'incidence et la mortalité due à cette maladie. Cependant, l'âge est un des facteurs principaux et inéluctables.

En fonction du type de cancer, de sa localisation, du stade de la maladie ainsi que de l'état général du patient, différents traitements peuvent être envisagés. Les plus couramment utilisés sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Souvent, une combinaison de ces traitements est nécessaire pour soigner les patients.

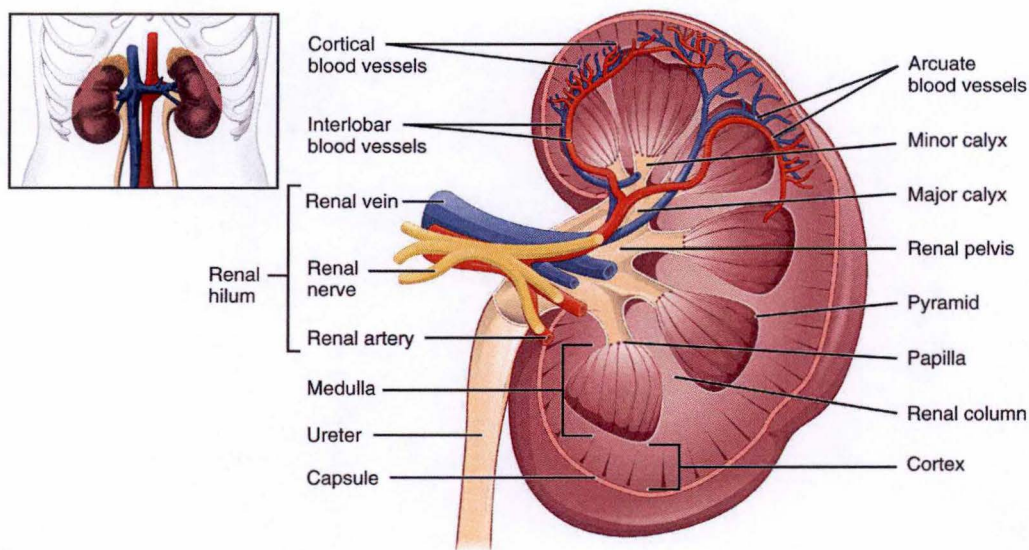
Malgré la diversité grandissante et les avancées majeures dans les traitements anti-cancéreux ces dernières décennies, la maladie reste dans de nombreux cas incurable. Une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux traitements mis en place par les cellules cancéreuses est donc bien plus que nécessaire afin d'améliorer les traitements et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude sur TMEM45A, une protéine impliquée dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses face aux agents chimiothérapeutiques.

Afin de faciliter la compréhension des expériences et des résultats obtenus, ce travail débutera par une introduction reprenant une série d'informations et de notions théoriques sur les cancers rénaux, les agents chimiothérapeutiques, le concept d'hypoxie en rapport avec la chimiorésistance et finalement, la description de données concernant TMEM45A.



# I. INTRODUCTION

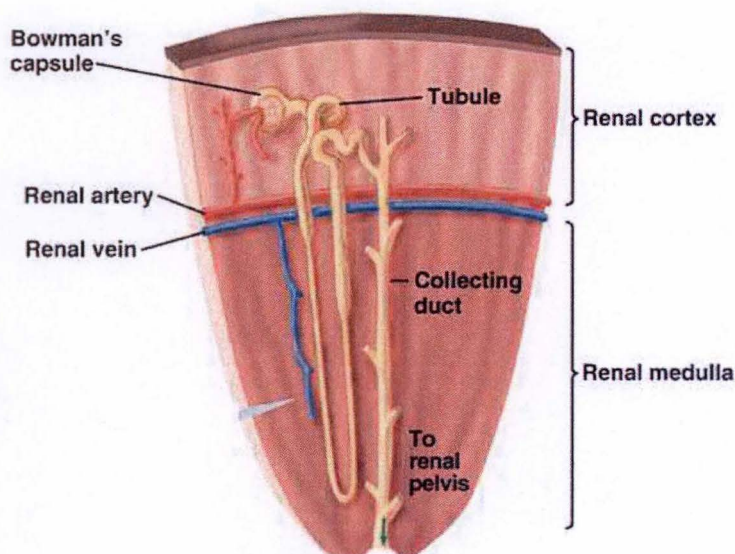




**Figure I.1: Anatomie interne du rein.**

Une coupe frontale à travers le rein révèle une région superficielle appelée le cortex rénal et une région profonde appelée la médulla composée de pyramides rénales. Les pyramides et le cortex qui les entoure constituent les lobes rénaux. A la base de chaque pyramide rénale se trouve une papille qui est un canal collecteur transportant l'urine produite par les néphrons vers les calices du rein pour l'excrétion.

Anatomy and Physiology, « Gross Anatomy of the Kidney », <http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46429.html>



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

**Figure I.2 : Représentation schématique d'un néphron.**

Le néphron représente l'unité fonctionnelle du rein. Il filtre le sang et excrète des toxines et des déchets métaboliques dans l'urine pour maintenir l'équilibre du milieu interne de l'organisme.

Human Anatomy Library, « Excretory System Diagram », <http://humananatomylibrary.com/excretory-system-diagram/>



# **1 Le cancer rénal**

## **1.1 Anatomie et fonctions du rein**

Les reins sont des organes pairs rougeâtres en forme de haricots situés de part et d'autre de la colonne vertébrale. Ils sont localisés juste au-dessus de la taille et plus précisément, en position rétropéritonéale dans la région lombaire supérieure.

Chez l'adulte, le rein normal pèse environ 150 g et mesure en moyenne 11 cm de long, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur. Au centre du bord concave du rein se trouve une échancrure verticale profonde appelée hilum rénal. C'est à ce niveau que l'uretère, les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques ainsi que les nerfs quittent le rein (Marieb and Katja, 2015; Tortora and Grabowski, 2001) (Figure I.1).

Sous la capsule rénale, l'anatomie interne du rein se divise en trois parties distinctes : le cortex, la médulla et le pelvis. Le cortex rénal est une zone rougeâtre superficielle qui recouvre la médulla, une zone profonde de couleur rouge-brun constituée de tissus coniques appelés pyramides rénales. Chaque pyramide forme, avec le tissu cortical qui l'entoure, un lobe rénal. A la base de chacune d'elles se trouve également une papille rénale qui débouche vers un calice rénal qui aboutit lui-même au pelvis rénal. Le pelvis rénal, ou bassinet, est un tube en forme d'entonnoir qui communique avec l'uretère.

Ensemble, le cortex et les pyramides rénales de la médulla constituent la partie fonctionnelle du rein où se trouvent les néphrons, les unités structurales et fonctionnelles qui accomplissent les grandes tâches du rein (Marieb and Katja, 2015; Tortora and Grabowski, 2001) (Figure I.2).

Les reins sont les organes dans lesquels les principales fonctions du système urinaire sont effectuées. Ils filtrent le sang et excrètent des toxines provenant du foie ainsi que divers déchets métaboliques tels que l'urée et les ions en excès dans l'urine, pour maintenir l'équilibre du milieu interne de l'organisme (Marieb and Katja, 2015; Tortora and Grabowski, 2001).

## **1.2 Classification et caractéristiques des cancers rénaux**

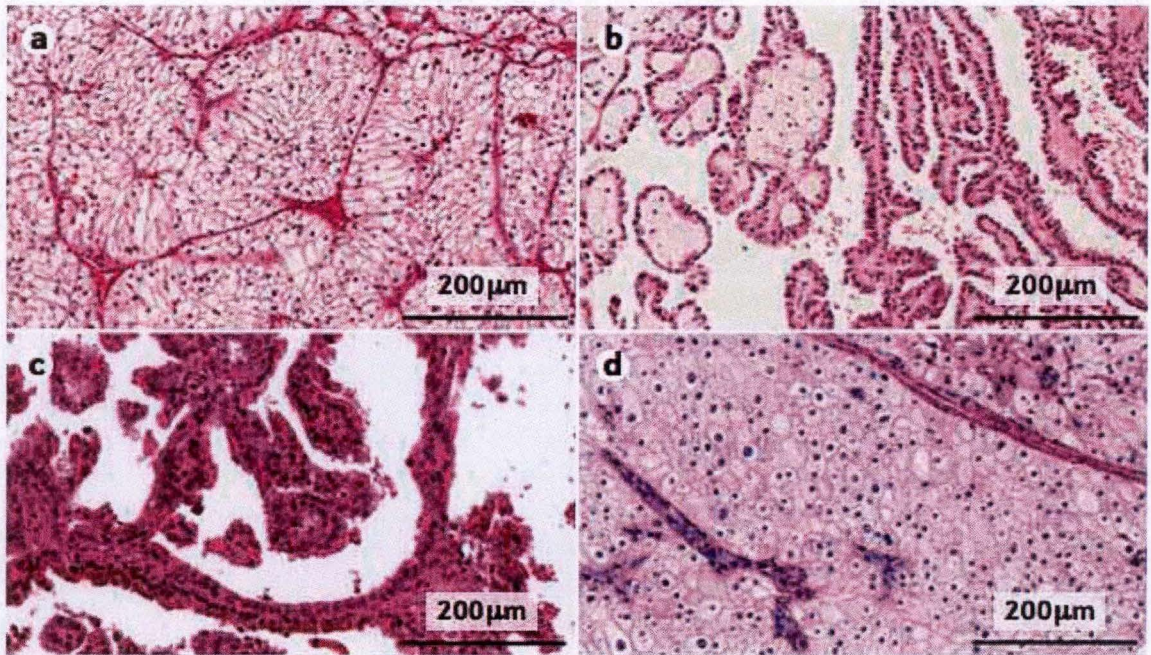
Les cancers rénaux sont des tumeurs malignes prenant naissance au niveau des cellules du rein et pouvant être classés en fonction de leur origine de développement dans l'organe. Chez l'adulte, les cancers rénaux qui se développent au niveau du parenchyme rénal sont appelés les carcinomes à cellules rénales. Ceux se formant au niveau du pelvis rénal se nomment carcinomes du tractus urinaire supérieur ou tout simplement cancers du pelvis rénal. Chez l'enfant, la majorité des cancers rénaux sont des néphroblastomes (Chow, Dong & Devesa, 2010).

### **1.2.1 Les carcinomes à cellules rénales**

Les carcinomes à cellules rénales (RCC) surgissent dans le parenchyme rénal et constituent le groupe majoritaire des cancers rénaux en représentant environ 90% de l'ensemble. Ils forment un groupe de cancers hétérogènes tous dérivés de l'épithélium tubulaire des néphrons, pouvant eux-mêmes être classés en différents sous-types. Ces sous-types se distinguent entre eux par des différences génétiques, biologiques et comportementales.

Le sous-type le plus commun est le RCC à cellules claires (ccRCC), qui représente 75 à 80 % des cas de carcinomes rénaux. Le RCC papillaire (pRCC), le RCC chromophile (chRCC) et





**Figure I.3 : Sous-types distincts de carcinomes à cellules rénales.**

Environ 75% des carcinomes à cellules rénales (RCC) sont des RCC à cellules claires (a). Les RCC papillaires représentent environ 15% et sont divisés en deux types selon les caractéristiques de coloration : type 1 (basophile, b) et type 2 (éosinophile, c). Les RCC chromophobes représentent environ 5% des tumeurs rénales (d) (Hsieh et al., 2017).



d'autres formes plus rares constituent les sous-types restants. Les tumeurs qui ne rentrent dans aucune de ces catégories sont appelées RCC non classifiés (uRCC) (Cairns, 2010) (Figure 1.3).

Les ccRCC sont histologiquement prédominants dans les métastases et sont responsables de la majorité des décès dans les cancers du rein (Hsieh et al., 2017). Cela peut être dû aux changements génétiques et au remodelage du métabolisme cellulaire qui se produisent lors de cancers agressifs, et qui sont dans la plupart des cas associés aux mutations du gène von Hippel-Lindau (*VHL*) (Creighton et al., 2013; Wettersten et al., 2017). Le ccRCC peut être sporadique (plus de 96 %) ou familial (moins de 4 %), mais dans les deux cas, *VHL*, un gène suppresseur de tumeur, est le gène le plus fréquemment muté. En effet, la délétion du chromosome 3p est considérée comme étant un événement primaire dans la carcinogenèse des ccRCC (Cheng et al., 2009). L'inactivation du gène *VHL*, qui est situé sur le chromosome 3p25, est donc une caractéristique de ccRCC et ne se trouve pas dans les autres types de RCC (Brugarolas, 2013; Cairns, 2010).

### 1.2.2 Les carcinomes du tractus urinaire supérieur

Les cancers du pelvis rénal, également connus sous le nom de carcinomes du tractus urinaire supérieur, sont des tumeurs malignes rares qui comptent pour moins de 10% des cancers rénaux. Ces cancers sont originaires de la muqueuse du pelvis qui est composée de cellules appelées cellules transitionnelles, similaires à celles des uretères et de la vessie (Guinan et al., 1992; Kirkali and Tuzel, 2003).

### 1.2.3 Les néphroblastomes chez l'enfant

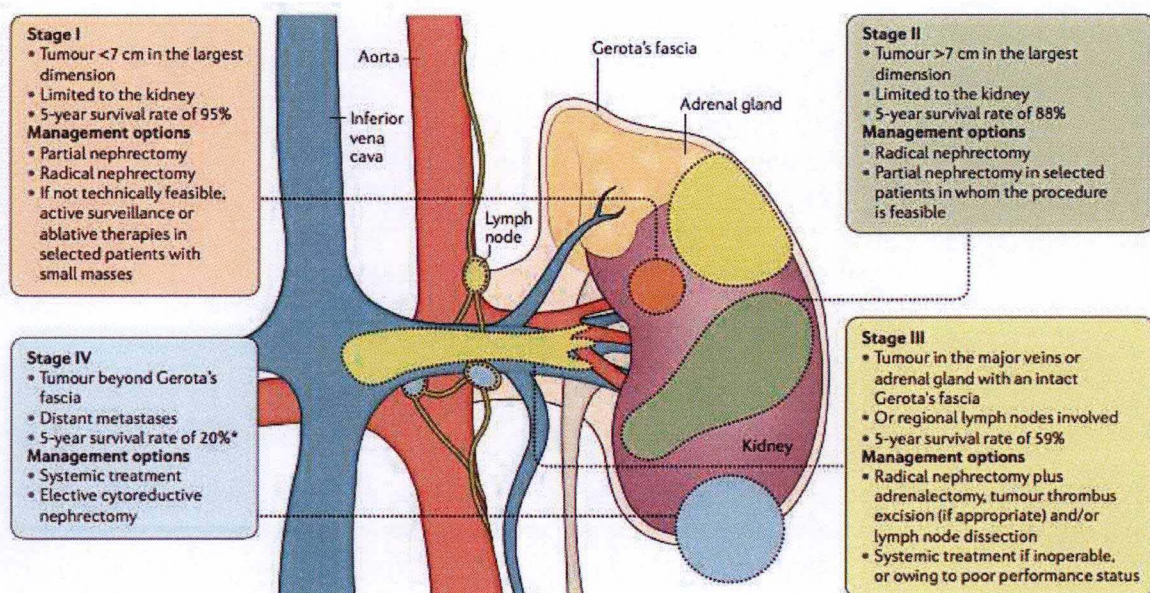
Bien que les cancers rénaux se manifestent en grande majorité chez l'adulte, certaines tumeurs malignes peuvent également survenir chez l'enfant dans de rares cas. Le néphroblastome, aussi appelé tumeur de Wilms, est le cancer rénal le plus fréquent chez l'enfant et extrêmement rare chez l'adulte. Il compte pour près de 1 % des cancers rénaux et est souvent décrit comme une tumeur embryonnaire, par sa provenance des cellules embryonnaires dans lesquelles la croissance et/ou la différenciation sont dérégulées au cours du développement (Chow et al., 2010; Mahamdallie et al., 2015).

Dans la suite de ce mémoire, l'intérêt se portera essentiellement sur le type de cancer rénal le plus répandu et le plus étudié : les ccRCC.

## 1.3 Incidence, facteurs de risque et symptômes cliniques

Le cancer du rein constitue le treizième cancer le plus courant à travers le monde. Chaque année, environ 295 000 nouveaux cas de cancer du rein sont diagnostiqués et 134 000 décès sont enregistrés dans le monde entier. Au niveau européen, il se situe à la septième place avec plus de 84 000 nouveaux cas diagnostiqués et environ 35 000 décès relevés. L'incidence du cancer du rein est fortement corrélée avec l'âge. Près de la moitié des personnes diagnostiquées pour ce cancer sont âgées de 60 à 70 ans, les hommes étant plus touchés que les femmes avec un ratio de 2 :1 (Hsieh et al., 2017). De plus, son incidence varie dans le monde entier avec un impact plus élevé dans les pays développés que dans les pays en voie de développement (Capitanio and Montorsi, 2016). Dans l'ensemble, le taux d'incidence a augmenté dans la plupart des populations durant les dernières décennies, alors que le taux de mortalité s'est quant à lui stabilisé et a même parfois diminué. Ce profil divergent d'incidence croissante et de mortalité décroissante est particulièrement marqué dans les pays développés. Cela peut en partie s'expliquer par l'utilisation accrue de techniques d'imagerie pour d'autres





**Figure I.4 : Stades du cancer rénal et traitements recommandés.**

L'établissement du stade du carcinome à cellules rénales (RCC) est basé sur la taille et la position de la tumeur, ainsi que l'atteinte des ganglions lymphatiques. Une tumeur de stade I ou II reste entièrement enfermée dans le rein. Les tumeurs de stade III peuvent s'étendre dans les veines principales ou les glandes surrénales dans le fascia de Gerota (la couche de tissu conjonctif encapsulant les reins et les glandes surrénales) ou peuvent impliquer un ganglion lymphatique régional. Les tumeurs de stade IV peuvent envahir au-delà du fascia de Gerota et/ou forment des métastases à distance. Après établissement du stade, des traitements adaptés sont alors recommandés. Par exemple, les patients ayant un RCC de stade I et qui sont aptes à subir une intervention chirurgicale sont généralement traités par une néphrectomie partielle. Pour certains cas, la néphrectomie radicale est également une option. Pour les patients âgés ou ceux qui ne peuvent pas être opérés en raison de comorbidités, une surveillance active ou des traitements ablatifs sont recommandés. Chez les patients atteints d'un RCC de stade III, une néphrectomie radicale est recommandée avec une dissection des ganglions lymphatiques chez les patients dont les ganglions lymphatiques sont cliniquement hypertrophiés, mais les thérapies systémiques sont recommandées pour les personnes inopérables ou atteintes de maladies étendues (Hsieh et al., 2017).



indications médicales qui ont permis de détecter davantage de RCC de manière accidentelle et de façon plus précoce (Cairns, 2010; Hsieh et al., 2017).

Divers facteurs de risque tant constitutifs qu'environnementaux sont connus pour le cancer rénal. Parmi les facteurs les plus importants se trouvent notamment le tabagisme, l'obésité, l'hypertension et une mauvaise alimentation, qui influencent de manière négative le risque de développer un cancer rénal. Certains individus qui présentent des antécédents familiaux sont plus prédisposés à développer un cancer rénal étant donné que 2 à 4 % des cancers rénaux sont héréditaires. Les personnes étant à un stade avancé de maladie rénale chronique sous dialyse depuis un long moment ou encore après une transplantation rénale sont également plus à risque de développer un cancer rénal (Cairns, 2010; Chow et al., 2010).

Les manifestations cliniques précoces du RCC sont diverses et peuvent donner lieu à une gamme de symptômes non spécifiques et souvent mal attribués. Seulement 10 % des individus avec RCC présentent la triade de symptômes classiques: une hématurie, une masse abdominale palpable et des douleurs au flanc. Ces individus s'avèrent, pour la plupart, être déjà à un stade avancé de la maladie. En effet, près de la moitié des individus atteints de RCC ne présentent aucun de ces trois symptômes et actuellement, plus de 60 % des RCC sont détectés accidentellement chez les patients lors d'exams cliniques procédés pour une toute autre raison (Cairns, 2010).

### **1.4 Diagnostic et traitements**

Dans de nombreux cas, les RCC sont détectés par des échographies abdominales. Cependant, les limites de spécificité et d'exactitude rendent nécessaire l'utilisation de l'imagerie TDM (tomodensitométrie) aussi appelée imagerie scanographique, ou de l'IRM (imagerie par résonance magnétique) pour confirmer les résultats suspects. Les objectifs principaux de ces techniques sont de caractériser la masse tumorale et les métastases abdominales possibles, l'extension de la tumeur ainsi que l'implication veineuse pour pouvoir établir un plan de traitement pour le patient (Capitanio and Montorsi, 2016).

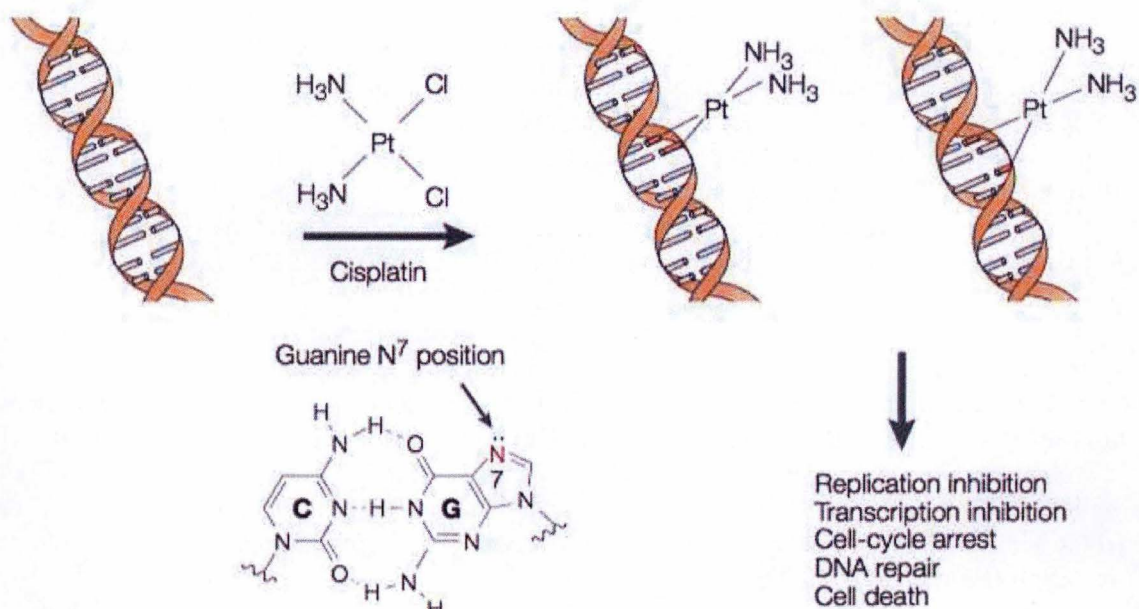
Le choix du type de traitement à favoriser est guidé par le stade de la tumeur qui est établi sur base de la taille, la position et l'atteinte des ganglions lymphatiques. Ainsi, une tumeur de stade I ou de stade II reste entièrement restreinte au niveau du rein. Les tumeurs de stade III peuvent s'étendre dans les veines principales ou les glandes surrénales dans le fascia Gerota (la couche de tissu conjonctif encapsulant les reins et les glandes surrénales) et peuvent aussi impliquer un ganglion lymphatique régional. Les tumeurs de stade IV envahissent au-delà de la fascia Gerota et/ou forment des métastases à distance (Hsieh et al., 2017).

Généralement, après que le stade de la tumeur ait été déterminé, le patient est traité par excision chirurgicale avec une néphrectomie partielle ou radicale si la tumeur est localisée. En revanche, les patients avec un RCC inopérable ou métastatique subissent typiquement un traitement systémique utilisant des agents chimiothérapeutiques (Cairns, 2010; Hsieh et al., 2017) (Figure I.4).

## **2 Les agents chimiothérapeutiques dans le cancer**

### **2.1 Agents chimiothérapeutiques et leurs mécanismes d'action**

Les débuts de l'ère moderne de la chimiothérapie ont commencé dans les années 1940 par la découverte des propriétés anti-tumorales des moutardes azotées lors d'autopsies de corps de



**Figure I.5 : Mécanisme d'action du cisplatine.**

Une fois dans la cellule, le cisplatine subit une aquation pour former du  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$  et  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$  en raison de la différence de concentration en chlorure entre l'extérieur (100 mM) et l'intérieur (4-12 mM) des cellules. L'atome platine du cisplatine se lie alors de manière covalente à la position N<sup>7</sup> des purines pour former des liaisons 1,2 ou 1,3 intra-brins, et des liaisons inter-brins. Les adduits formés enclenchent la réponse aux dommages à l'ADN et provoquent diverses réponses cellulaires, telles que l'arrêt de la réplication, l'inhibition de la transcription, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Wang & Lippard, 2005).



soldats exposés à ces agents durant la Première Guerre Mondiale (Chabner and Roberts, 2005). Depuis lors, les recherches sur les agents chimiothérapeutiques se sont multipliées et aujourd'hui encore, les tentatives de développer des médicaments de plus en plus spécifiques pour traiter le cancer ne manquent pas.

La plupart des agents chimiothérapeutiques actuellement utilisés tentent d'agir en inhibant une des majeures caractéristiques des cellules cancéreuses qui est leur capacité à proliférer de façon indéfinie pour induire l'apoptose. Ces agents sont généralement classés en fonction de leurs mécanismes d'action sur les cellules cancéreuses (Payne and Miles, 2008).

### 2.1.1 Les agents alkylants

Les agents alkylants sont des composés très électrophiles qui forment des groupements alkyles au niveau des atomes d'azote (N) cycliques et des atomes d'oxygène (O<sub>2</sub>) extracycliques des bases de l'ADN, pour produire différents types d'adduits. Le profil des lésions générées dans l'ADN dépend du nombre de sites actifs au sein de l'agent alkylant, de la particularité de son activité chimique et du type de groupement alkyle ajouté. Toutefois, en raison de la forte réactivité nucléophile de la position N7 et de la position O6 de la guanine, les agents alkylants induisent plus de dommages au niveau de cette base nucléique de l'ADN (Fu et al., 2012).

L'alkylation de bases peut mener à la formation de ponts au sein d'une même molécule d'ADN (lien intra-brin) ou entre deux molécules d'ADN (lien inter-brin), à un mauvais appariement de la guanine altérée avec une thymine, mais aussi à des cassures de brins d'ADN. Ces dommages à l'ADN provoquent un arrêt de la transcription, de la réplication et du cycle cellulaire, et induisent l'apoptose (Drabløs et al., 2004; Weber, 2015).

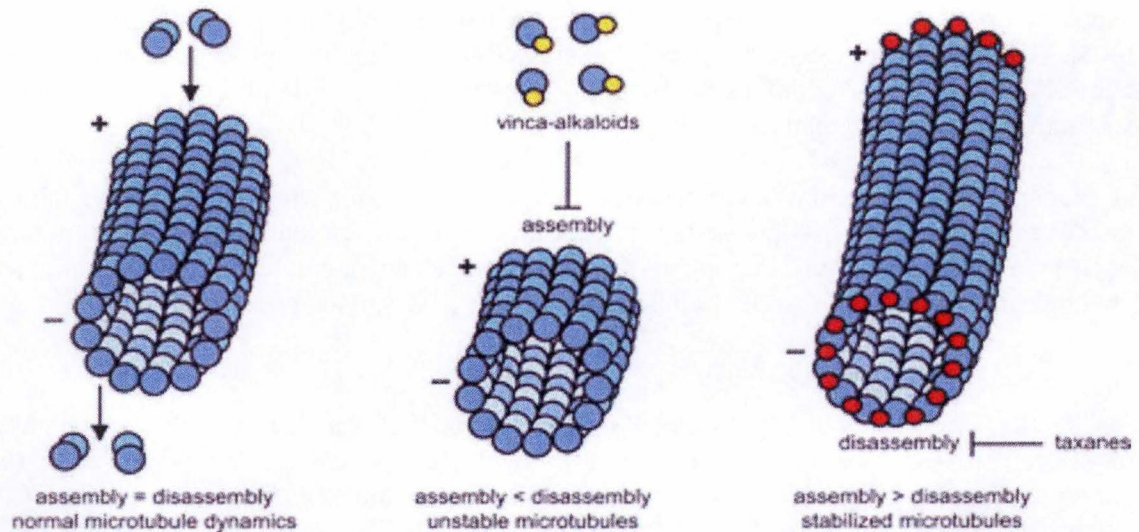
Parmi les plus connus se trouvent les moutardes azotées dont le groupe bischloroéthyle représente la structure essentielle à l'alkylation des nucléotides (Siddik, 2002). Les agents alkylants à base de platine tels que le cisplatine sont également utilisés pour traiter de nombreux cancers. Le mode d'action du cisplatine repose sur sa capacité à induire des altérations structurales de la double hélice menant à une distorsion plus ou moins importante de l'ADN pour causer des dommages et induire l'apoptose de la cellule. Son activité cytotoxique nécessite sa configuration en *cis*, celle en *trans* s'étant révélée inefficace (Dasari & Tchounwou, 2014; Siddik, 2002) (Figure I.5).

### 2.1.2 Les anti-mitotiques

Les anti-mitotiques sont des composés chimiques qui ciblent les microtubules. Les microtubules sont des structures creuses et dynamiques, composées de 13 filaments eux-mêmes formés de polymères de tubuline. La régulation de l'assemblage et du démontage garantit la dynamique des microtubules qui est essentielle à leur bon fonctionnement. Les microtubules jouent un rôle majeur dans le cytosquelette, la polarité et le maintien de la forme de la cellule, ainsi que dans le transport intracellulaire des vésicules. En plus de cela, ils forment le fuseau mitotique qui est la machinerie clé permettant l'alignement des chromosomes répliqués sur le plan équatorial pour permettre la ségrégation subséquente des chromosomes dans les deux cellules filles au cours de la division cellulaire. Ce rôle crucial fait d'eux des cibles très appropriées pour le développement de médicaments chimiothérapeutiques ciblant les cellules cancéreuses à division rapide (Van Amerongen and Berns, 2006; Zhou and Giannakakou, 2005).

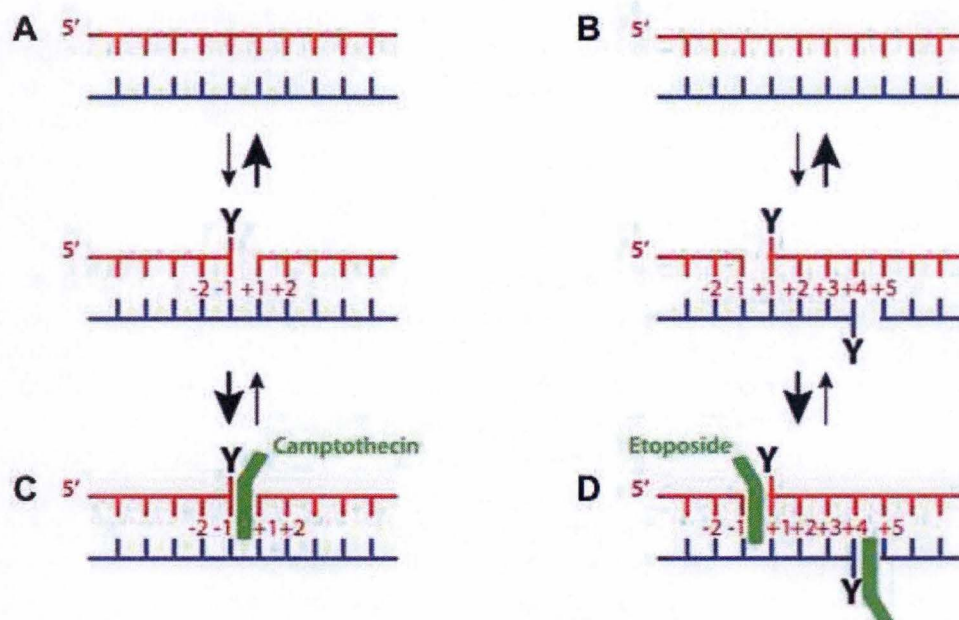
Les médicaments anti-mitotiques ciblant les microtubules affectent le réseau des microtubules de différentes manières. Les deux principaux groupes sont les vinca-alcaloïdes et les taxanes. Les vinca-alcaloïdes, tels que la vincristine et la vinblastine se lient aux monomères de





**Figure I.6 : Mécanisme d'action des anti-mitotiques.**

Les microtubules sont des structures creuses et dynamiques, composées de 13 filaments, eux-mêmes formés de polymères de tubuline. La régulation de l'assemblage et du démontage garantit une dynamique correcte des microtubules. Les médicaments anti-mitotiques ciblant les microtubules affectent le réseau des microtubules de différentes manières. Les vinca-alkaloïdes se lient aux monomères de tubuline, les empêchant ainsi d'être incorporés dans les microtubules en croissance. Les taxanes, tels que le paclitaxel, ont l'effet inverse. Au lieu d'empêcher l'assemblage des microtubules, ces médicaments interagissent avec la tubuline ayant déjà été incorporée dans les microtubules. Ils stabilisent la structure et empêchent le désassemblage à l'extrémité négative (Van Amerongen and Berns, 2006).



**Figure I.7 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de topoïsomérase.**

Dans des conditions normales, la topoïsomérase I (a) et les deux monomères de la topoïsomérase II clivent et ligaturent l'ADN très rapidement. Les inhibiteurs de topoïsomérase (vert) tels que la camptothécine (c) et l'étoposide (d) se lient de manière réversible à l'interface de l'ADN clivé et de l'enzyme pour empêcher la religation de l'ADN, ce qui crée des cassures dans l'ADN (Pommier, 2013).



tubuline pour les empêcher d'être incorporés à l'extrémité positive des microtubules en croissance. Les taxanes, tels que le paclitaxel, exercent un effet inverse. Ils interagissent avec la tubuline déjà incorporée dans les microtubules et stabilisent leur structure en empêchant le désassemblage à l'extrémité négative. Ainsi, les anti-mitotiques perturbent la dynamique des microtubules et provoquent un arrêt de la mitose et la mort cellulaire subséquente (Van Amerongen and Berns, 2006; Zhou and Giannakakou, 2005) (Figure I.6).

Malgré leur efficacité pour traiter les cancers, ces anti-mitotiques ciblant les tubules ont montré certains effets secondaires tels que des neurotoxicités qui affectent le mouvement, la sensation et même la fonction des organes. Depuis lors, les efforts se sont concentrés sur le développement de médicaments ciblant également les kinases, les protéines motrices, et les complexes multi-protéiques impliqués dans la mitose, mais qui sont à ce jour encore au stade d'essais cliniques (Dominguez-Brauer et al., 2015).

### 2.1.3 Les inhibiteurs de topoïsomérases

Les inhibiteurs de topoïsomérases ont la capacité d'inhiber l'action des topoïsomérases, responsables de la modification de la structure 3D de l'ADN par des réactions de clivage, déroulement puis liaison de l'ADN. Ils sont impliqués dans la distorsion de l'ADN durant la réplication, la ségrégation des chromatides et la transcription (Pommier et al., 2016). Les topoïsomérases I et II ont des mécanismes catalytiques différents. Les enzymes de type I clivent un brin pour dérouler l'ADN tandis que le type II clive les deux brins par une action concertée de chacun des deux monomères Top2 (Pommier, 2013). Les inhibiteurs des topoïsomérases présentent différents mécanismes d'action mais agissent tous en s'interposant entre la topoïsomérase et l'ADN. Ceci crée des cassures de l'ADN et induit l'apoptose.

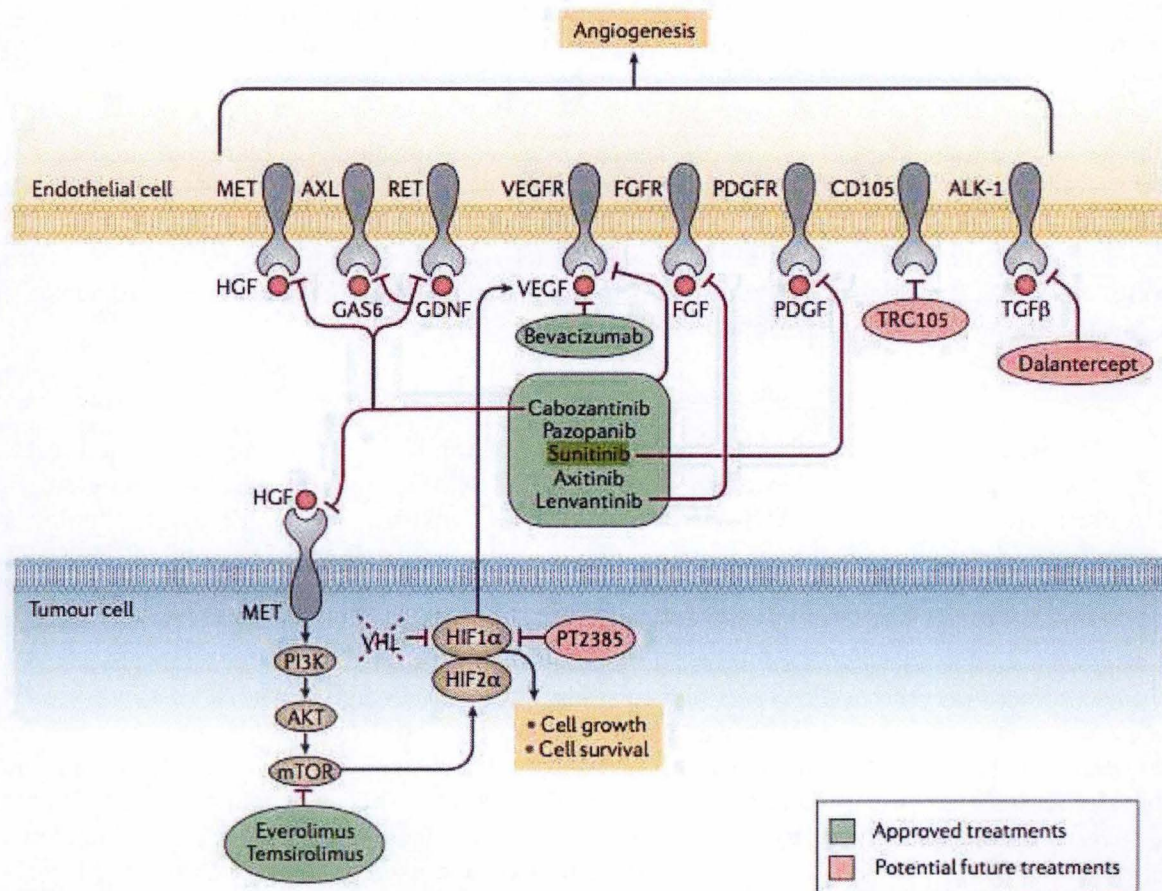
Par exemple la camptothécine, un inhibiteur de topoïsomérase I, se fixe et emprisonne la topoïsomérase I après le clivage d'un brin de l'ADN pour inhiber la religation des fragments d'ADN (Pommier, 2006). Certains inhibiteurs de la topoïsomérase II tels que l'étoposide, agissent comme des poisons en stabilisant le complexe de clivage ADN-topoïsomérase II pour provoquer des cassures double brins et inhiber la transcription ou la réplication (Nitiss, 2009) (Figure I.7).

### 2.1.4 Les inhibiteurs de tyrosine kinases

Les tyrosine kinases jouent un rôle critique dans la modulation de la signalisation des facteurs de croissance. Elles peuvent être classées comme protéine kinases réceptrices et protéine kinases non réceptrices. Les tyrosine kinases réceptrices sont des protéines de surface cellulaire qui jouent un rôle essentiel dans la transduction de signaux extracellulaires dans le cytoplasme. La liaison du ligand induit la dimérisation de ces tyrosine kinases réceptrices, ce qui entraîne l'autophosphorylation de leurs domaines cytoplasmiques et l'activation de l'activité tyrosine kinase. Par ailleurs, les tyrosine kinases non réceptrices relaient les signaux intracellulaires. Leur activation induit une transduction de signal à travers de multiples voies de signalisation cytoplasmiques qui peuvent provoquer une augmentation de la prolifération et de la croissance des cellules tumorales, induire des effets anti-apoptotiques et favoriser l'angiogenèse et les métastases. En plus de l'activation par des facteurs de croissance, l'activation de protéine kinase par des mutations somatiques est un mécanisme commun de la tumorigenèse. De ce fait, les tyrosine kinases représentent des cibles clés pour les traitements anti-cancéreux (Arora and Scholar, 2005).

Un exemple connu et couramment utilisé dans les RCC est le sunitinib. Cette molécule inhibitrice agit sur les récepteurs VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) et





**Figure I.8 : Cibles des agents chimiothérapeutiques utilisés dans les RCC.**

La perte de *VHL* (qui code pour pVHL) est la caractéristique génétique la plus fréquente du carcinome rénal à cellules claires (ccRCC). Sa perte entraîne une augmentation de l'expression des gènes cibles de HIF (hypoxia inducible factor) qui engendrent des changements dans le métabolisme cellulaire et la signalisation qui favorisent la survie cellulaire. Par exemple, plusieurs kinases critiques pour l'angiogenèse comme la tyrosine-protéine kinase MET (également connue sous le nom de récepteur du facteur de croissance hépatocytaire), l'oncogène AXL (également connu sous le nom de récepteur tyrosine-protéine kinase UFO), le proto-oncogène tyrosine-protéine kinase RET, le VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), le FGFR (fibroblast growth factor receptor), le PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), le CD105 (également appelé endogline) et ALK-1 (activin receptor-like kinase 1) sont surexprimées et/ou hyperactives dans les tumeurs. Les agents pharmacologiques couramment utilisés et les médicaments en cours de développement ciblent donc ces kinases (Posadas et al., 2013).



PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et l'angiogenèse (Posadas et al., 2013) (Figure I.8).

### 2.1.5 Les anti-métabolites

Les anti-métabolites sont définis comme étant des composés chimiques qui présentent une similarité structurale avec des substances métaboliques naturelles des cellules. Lorsqu'ils sont introduits au sein de la cellule, ils entrent en compétition avec le substrat naturel soit pour inhiber une ou plusieurs enzymes soit pour substituer des nucléosides dans le but d'interférer avec la synthèse de l'ADN (Kaye, 1998; Parker, 2009).

Un des exemples d'analogie nucléosidique le plus connu est le 5-fluorouracil (5-FU), une fluoropyrimidine, exerçant sa fonction d'agent anti-cancéreux en étant incorporé à la place des pyrimidines de l'ADN ou de l'ARN et perturbant ainsi la synthèse d'acides nucléiques (Sampath et al., 2003).

### 2.1.6 Les antibiotiques anti-tumoraux

Les antibiotiques anti-tumoraux, souvent isolés à partir de microorganismes, peuvent exercer des activités anti-tumorales via des mécanismes très variés.

Par exemple, l'actinomycine D est capable de s'insérer entre les paires de bases guanine et cytosine pour interférer avec la transcription de l'ADN. Les anthracyclines quant à elles exercent les mêmes actions que les inhibiteurs de la topoisomérase II tandis que la mitomycine C agit comme un agent alkylant (DeVita and Chu, 2008; Payne and Miles, 2008).

## 2.2 Agents chimiothérapeutiques utilisés dans les RCC

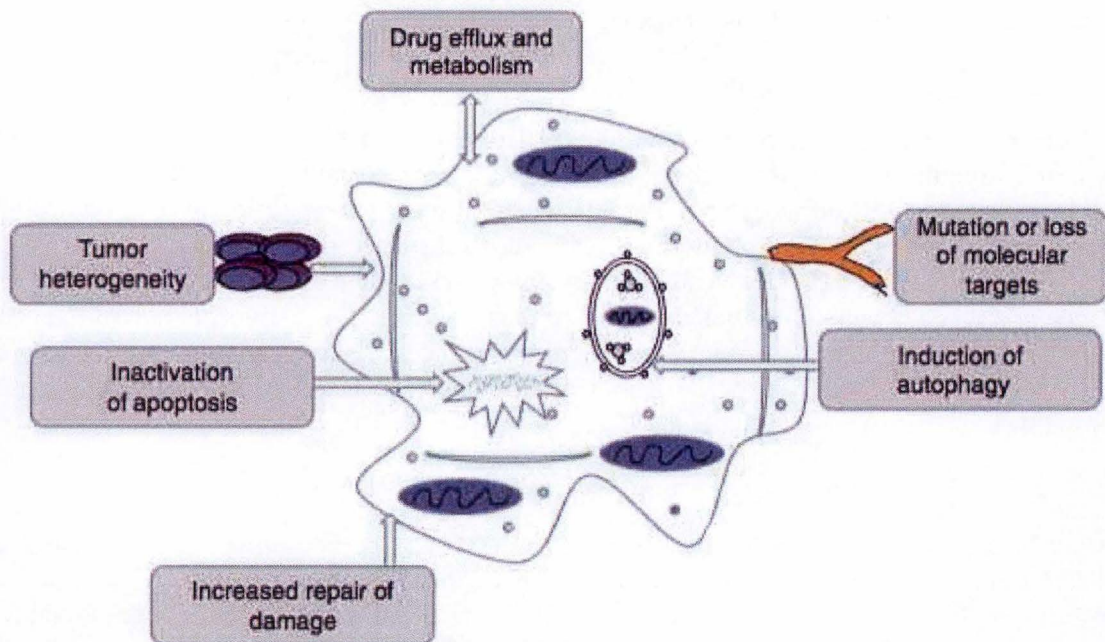
Comme mentionné précédemment, une des caractéristiques majeures des RCC est la mutation du gène *VHL* (Creighton et al., 2013). Cette mutation engendre des dérégulations importantes dans la voie *VHL/HIF1- $\alpha$*  et de la signalisation mTOR qui permettent la progression des RCC. En effet, la perte de *VHL* entraîne une augmentation de l'expression des gènes cibles de HIF (hypoxia inducible factor) qui engendrent des changements dans le métabolisme cellulaire et la signalisation qui favorisent la survie cellulaire. (Riazalhosseini and Lathrop, 2016) (voir le point « 3.2. HIF-1 »). De ce fait, l'identification de ces mécanismes a permis de cibler plus spécifiquement les acteurs clés de ces voies.

Suite aux anomalies se produisant dans la voie de signalisation *VHL/HIF1- $\alpha$* , les RCC affichent une angiogenèse accrue lors de leur développement. La majorité des agents chimiothérapeutiques utilisés pour traiter les RCC comprennent donc des inhibiteurs de tyrosine kinases, tels que le sunitinib, le sorafenib, l'axitinib et le pazopanib, ou encore des anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF (vascular endothelial growth factor), comme le bevacizumab.

Les inhibiteurs de la rapamycine mammalienne (mTOR), tels que le temsirolimus et l'everolimus, ciblent quant à eux la prolifération anormale et la survie des cellules cancéreuses des RCC (Lee and Tan, 2012; Posadas et al., 2013) (Figure I.8).

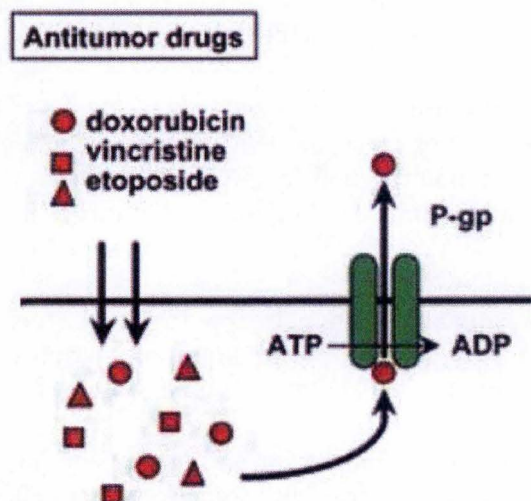
Pour le moment, les traitements se concentrent principalement sur les pistes mentionnées ci-dessus mais certaines voies régulées par d'autres gènes suppresseurs de tumeur fréquemment mutés dans les RCC tels que *PBRM1*, *BAP1* et *SETD2* sont étudiées dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les RCC (Brugarolas, 2013; Posadas et al., 2013).





**Figure I.9 : Diverses approches par lesquelles les cellules cancéreuses deviennent résistantes à la chimiothérapie.**

Différents processus permettent aux cellules cancéreuses de développer une résistance aux agents chimiothérapeutiques. Parmi ces processus se trouvent notamment l'efflux et le métabolisme de la drogue, l'hétérogénéité tumorale, l'inactivation de l'apoptose, l'augmentation des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, la mutation ou la perte des cibles, ainsi que l'induction de l'autophagie (Sui et al., 2013).



**Figure I.10 : La résistance multidrogue médiée par la glycoprotéine P.**

La glycoprotéine P, codée par le gène *MDR1*, transporte divers médicaments anticancéreux du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Cela se fait de manière dépendante de l'ATP (Tsuruo et al., 2003).



## 2.3 Mécanismes de résistance des cellules cancéreuses face aux agents chimiothérapeutiques

Bien que le traitement de certains cancers par la chimiothérapie mène à une rémission des patients, d'autres cas montrent des effets secondaires sur les tissus et cellules normaux ou conduisent au développement de résistance aux agents chimiothérapeutiques. La compréhension des mécanismes de résistance n'est pas encore complète mais de nombreuses études ont permis de décrire certains processus dont les plus importants sont les pompes à efflux, l'inactivation de drogue, l'altération de cible, la réparation des dommages à l'ADN, l'inhibition de l'apoptose et la survie cellulaire, mais également le rôle du microenvironnement tumoral (Housman et al., 2014) (Figure I.9).

### 2.3.1 Les pompes à efflux

Certains transporteurs transmembranaires ont été identifiés comme ayant un rôle dans la résistance aux médicaments. Le premier à avoir été découvert est MDR1 (multi-drug resistance protein 1), connu également sous le nom de glycoprotéine P. MDR1 est une pompe à efflux faisant partie de la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette), des protéines transmembranaires ATP-ases physiologiques dont le rôle est de réguler les flux d'agents chimiothérapeutiques à travers la membrane plasmique pour éviter l'accumulation de toxines dans la cellule (Gottesman, 2002; Holohan et al., 2013) (Figure I.10). Les cellules cancéreuses surexpriment certaines de ces pompes à efflux telles que MDR1 (Triller et al., 2006), BCPR (breast cancer resistance protein) (Doyle et al., 1998) et MRP1 (multi-drug resistance-associated protein 1) (Nooter et al., 1997; Zalcborg et al., 2000), ce qui leur confère une protection contre une variété d'agents chimiothérapeutiques (Housman et al., 2014).

### 2.3.2 L'inactivation de la drogue

Beaucoup de médicaments anti-cancéreux nécessitent une activation métabolique avant de pouvoir être actif cliniquement. Un autre mécanisme de résistance des cellules cancéreuses est l'inhibition de l'expression du gène codant pour l'enzyme responsable de l'activation du médicament.

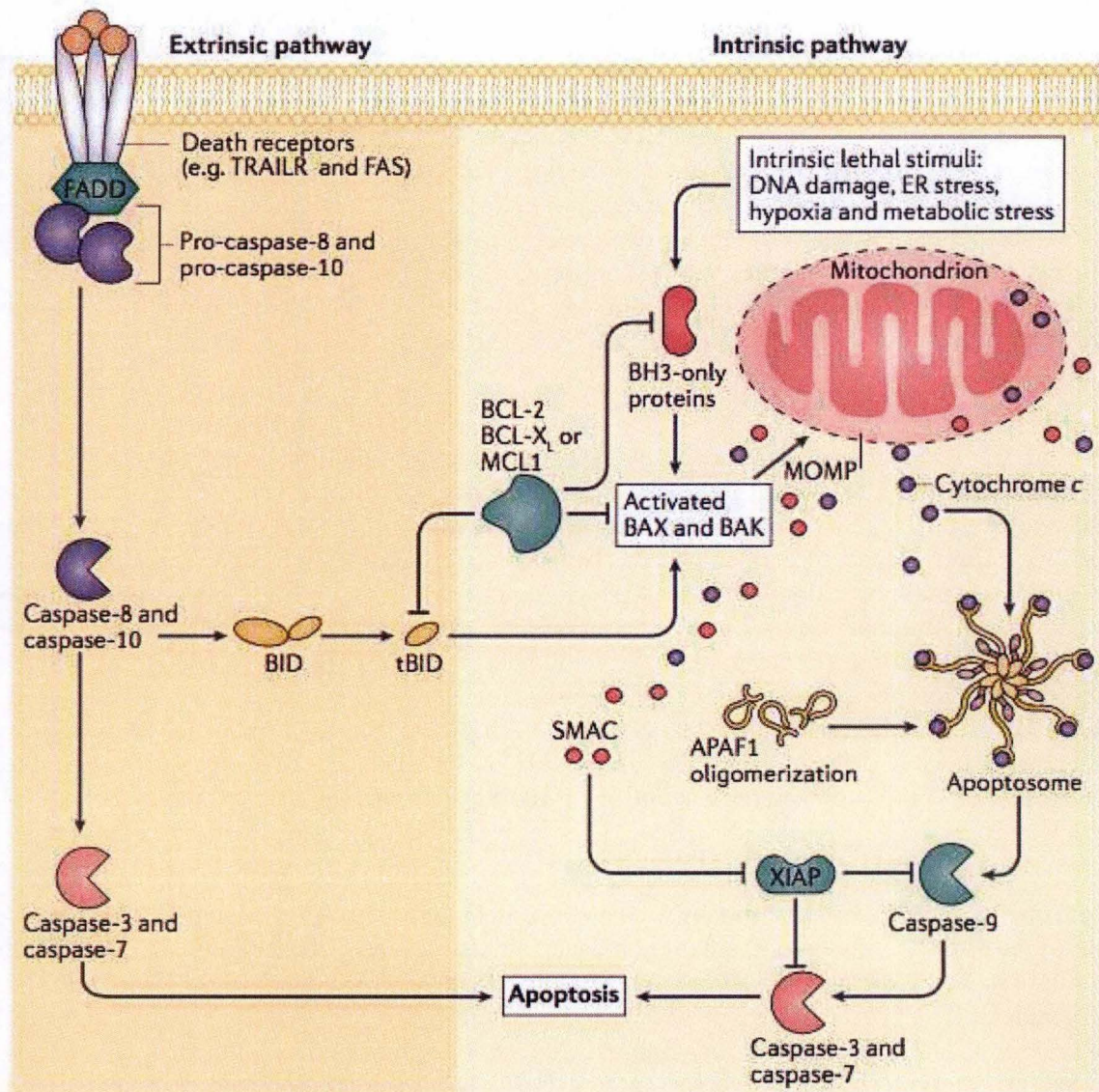
Par exemple, la capécitabine, un promédicament fluoropyrimidine inhibant la synthèse nucléique, est convertie en sa forme active 5-FU par la thymidine phosphorylase. Dans certaines cellules cancéreuses, le gène codant pour la thymidine phosphorylase est inactivé par méthylation, ce qui engendre une résistance à la capécitabine (Holohan et al., 2013; Kosuri et al., 2010).

### 2.3.3 L'altération de cible

Il est possible qu'au cours de la thérapie, la cible thérapeutique soit altérée suite à des mutations dans le gène qui l'encode ou à des modifications du niveau de l'expression de sorte qu'elle cesse d'avoir une influence sur la cellule (Holohan et al., 2013; Luqmani, 2005).

Un exemple assez courant de ce phénomène est la résistance des cellules cancéreuses au tamoxifène dans le cancer du sein. Le tamoxifène, un agent chimiothérapeutique anti-œstrogène, a pour cible le récepteur aux œstrogènes qui est généralement surexprimé dans le cancer du sein. Chez certaines patientes, la mutation du gène codant pour le récepteur aux œstrogènes induit l'expression de ce récepteur sous une forme altérée. Le tamoxifène n'est dès lors plus capable de lier ce récepteur aux œstrogènes altéré, induisant la résistance des cellules cancéreuses à cet agent chimiothérapeutique (Luqmani, 2005; Ring and Dowsett, 2004).





**Figure I.11 : Voies de signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.**

Dans la voie apoptotique extrinsèque, lors de la liaison à leur ligand apparenté, des récepteurs de mort tels que le récepteur TRAILR et le FAS peuvent activer les caspases initiateurs (caspases 8 et 10) grâce à leur trimérisation et le recrutement de protéines adaptatrices telles que la protéine FAD (FAD-associated death domain protein). Les caspases 8 et 10 clivent et activent les caspases 3 et 7, dites caspases effectrices, conduisant à l'apoptose. La voie intrinsèque (ou mitochondriale) de l'apoptose nécessite une perméabilisation mitochondriale de la membrane externe (MOMP). L'activation des protéines BH3-only induit l'activation de BAX et BAK, qui déclenchent à leur tour la MOMP. Les protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 s'opposent à ce processus. Après l'enclenchement de la MOMP, les protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial, comme SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) et le cytochrome c sont libérés dans le cytosol. Le cytochrome c interagit avec APAF1 (apoptotic protease activating factor 1), pour construire le complexe de l'apoptosome, qui active par la suite la caspase 9. La caspase 9 active à son tour les caspases 3 et 7, conduisant à l'apoptose. La libération mitochondriale de SMAC facilite l'apoptose en bloquant XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), un inhibiteur de caspases. Le clivage de BID (BH3-interacting death domain agonist) par la caspase 8 permet la communication entre les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose (Ichim and Tait, 2016).



### 2.3.4 La réparation des dommages à l'ADN

De nombreux médicaments chimiothérapeutiques induisent des dommages à l'ADN de manière directe ou indirecte. Par conséquent, la capacité des cellules cancéreuses à enclencher les facteurs DDR (DNA damage response) qui régulent les points de contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, a une influence majeure sur l'efficacité des médicaments. Cependant, des mutations ou des phénomènes épigénétiques se produisent couramment au niveau des gènes DDR dans de nombreux cancers et induisent une augmentation de l'instabilité génomique des cellules cancéreuses (Bouwman and Jonkers, 2012; Housman et al., 2014).

C'est notamment le cas dans le cancer du sein, pour lequel des études ont montré qu'une mutation dans le gène codant pour la protéine ATM est associée à un risque accru de développer le cancer. ATM possède de multiples fonctions, y compris un rôle central dans la réparation des cassures double brin de l'ADN. En réponse aux cassures double brin, ATM est recrutée sur des sites de dommages à l'ADN pour initier une cascade de signalisation par phosphorylation de plusieurs protéines. Sa mutation entraîne une déficience dans la réparation des cassures double brin, conduisant à une accumulation de lésions de l'ADN et, par conséquent, une augmentation de l'instabilité génomique des cellules (Ahmed and Rahman, 2006; Jeggo et al., 2016).

### 2.3.5 L'inhibition de l'apoptose et la survie cellulaire

L'apoptose, définie comme la mort cellulaire programmée, peut être activée par deux voies de signalisation (Figure I.11).

D'une part, la voie intrinsèque qui est médiée par les mitochondries, peut être induite par des signaux intracellulaires (tels qu'une déprivation de nutriments, une accumulation de radicaux libres,...) et implique les protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2) et la caspase 9. Les protéines appartenant à la famille Bcl-2 sont impliquées dans régulation de la perméabilité membranaire mitochondriale et peuvent jouer un rôle pro-apoptotique (telles que BAX, BAD, BAK) ou anti-apoptotique (telles que Bcl-2). La balance des composantes de la famille Bcl-2 est déterminante pour l'enclenchement de l'apoptose via la libération du cytochrome-c de la mitochondrie vers le cytosol.

D'autre part, il y a la voie extrinsèque qui implique des récepteurs de mort à la surface cellulaire, appelés les récepteurs de la famille TNFR (tumor necrosis factor receptor) et la caspase 8.

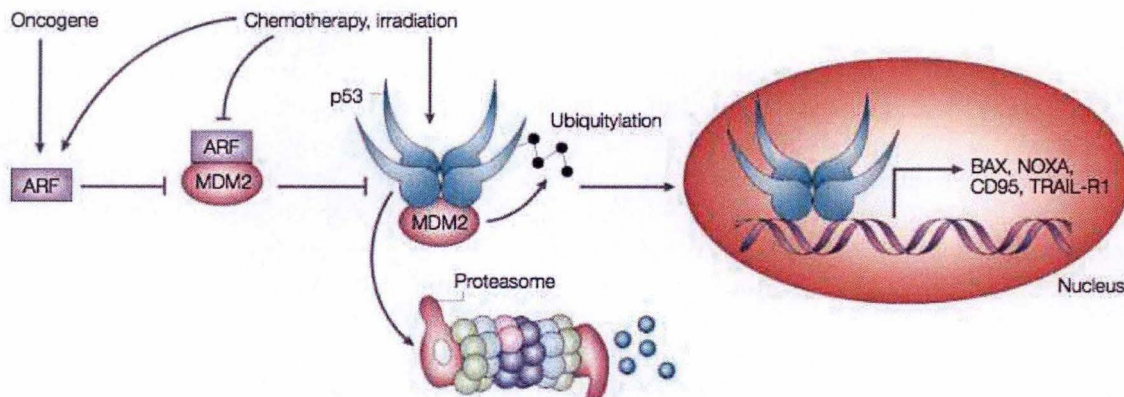
Suite à l'activation des caspases 8, 9 ou 10, dites initiatrices, les voies intrinsèque et extrinsèque convergent vers l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 qui provoquent finalement l'apoptose par le clivage de substrats parmi lesquels se trouve PARP (poly-(ADP-ribose) polymerase) (Housman et al., 2014).

L'un des objectifs principaux de l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques est d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Cependant, ces cellules peuvent acquérir une résistance à l'apoptose par divers mécanismes qui interfèrent à différents niveaux de signalisation de la voie apoptotique.

#### 2.3.5.1 *Surexpression des protéines anti-apoptotiques*

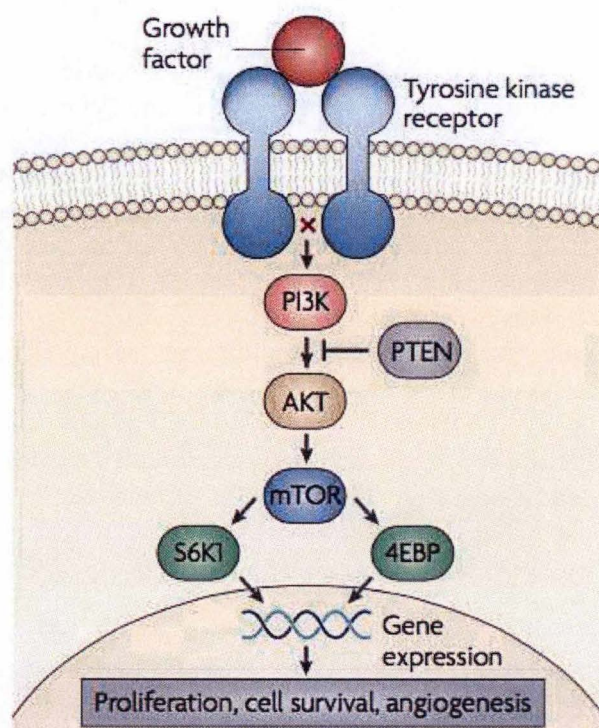
Premièrement, des gènes anti-apoptotiques sont souvent surexprimés dans certaines cellules cancéreuses. Parmi eux, les plus importants sont ceux qui codent pour les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 mais il y a également les récepteurs solubles des TNFR, les IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) et l'inhibiteur de la caspase 8, appelé FLIP (Holohan et al., 2013; Igney and Krammer, 2002).





**Figure I.12 : p53 et l'apoptose dans les cellules cancéreuses.**

p53 est un élément clé dans l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses. p53 est inhibée par MDM2, une ubiquitine ligase qui cible p53 pour la destruction par le protéasome. MDM2 est inactivé en se liant à ARF. Divers stress cellulaires, y compris ceux induits par la chimiothérapie ou l'irradiation, activent p53 soit directement, soit par inhibition de MDM2, soit indirectement par activation de ARF. ARF peut également être induite par des oncogènes prolifératifs tels que RAS. L'activation de p53 induit l'expression de gènes pro-apoptotiques, y compris BAX, NOXA, CD95 et TRAIL-R1 (tumeur-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1), pour favoriser l'apoptose (Igney and Krammer, 2002).



**Figure I.13 : Représentation simplifiée de la voie PI3K/Akt.**

L'activation de PI3K (phosphatidyl inositol 3 kinase) par des signaux physiologiques tels que des facteurs de croissance, induisent la phosphorylation et l'activation d'Akt. Akt activée peut à son tour réguler des substrats comme la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). La voie PI3K/Akt/ mTOR régule la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire et la survie cellulaire. La dérégulation et l'activation de cette voie sont associées à la tumorigénèse et à la progression du cancer. Cette voie possède un inhibiteur naturel appelé PTEN dont la fonction est de limiter la prolifération cellulaire (Holmes, 2011).



Plusieurs études ont montré une corrélation entre une surexpression de Bcl-2 et la résistance aux agents chimiothérapeutiques par échappement des cellules cancéreuses à l'apoptose, notamment dans la leucémie lymphoblastique aiguë chez l'enfant (Coustan-Smith et al., 1996; Igney and Krammer, 2002). D'autre part, des cellules cancéreuses surexpriment des récepteurs solubles de la famille des TNFR. Ces récepteurs solubles fonctionnent comme des leurres pour lier les ligands, ce qui empêche d'induire l'apoptose par la voie extrinsèque. Quant aux IAPs et FLIP, ils interfèrent avec l'apoptose en se liant aux caspases et en les inhibant (Igney and Krammer, 2002).

### *2.3.5.2 Diminution de l'expression de gènes pro-apoptotiques*

Outre la surexpression des gènes anti-apoptotiques, les cellules cancéreuses peuvent acquérir une résistance à l'apoptose suite à une diminution d'expression ou à la mutation de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques telles que BAX, BAD et BAK, ainsi que diverses protéines de la famille des BH3-only qui peuvent jouer des rôles d'antagonistes aux membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Holohan et al., 2013).

Une étude montre notamment qu'une expression réduite de BAX est associée à un faible taux de réponse face aux agents chimiothérapeutiques dans le cancer colorectal (Mirjolet et al., 2000).

### *2.3.5.3 Altérations de p53*

*TP53* est un gène suppresseur de tumeurs d'une importance capitale pour le maintien de l'intégrité du génome. Son produit, p53, est un facteur de transcription constitutivement produit mais continuellement dégradé. Après activation, il est responsable de la régulation de l'expression d'une multitude de gènes, notamment ceux impliqués dans la DDR et l'apoptose. Il est activé en réponse à divers signaux de stress tels qu'une hypoxie (diminution partielle en oxygène au sein d'un tissu), un stress oxydatif, un manque de nutriments ou encore des dommages à l'ADN comme ceux induits par la chimiothérapie. En réponse à ces stress, p53 se dissocie de son répresseur MDM2, une ubiquitine ligase qui cible p53 pour sa dégradation par le protéasome, ce qui permet une augmentation de l'abondance de p53. En fonction de la gravité des stress induits, p53 peut soit mener à la survie cellulaire, soit mener à l'apoptose. Des altérations de la voie p53 peuvent dès lors perturber la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose (Igney and Krammer, 2002) (Figure I.12).

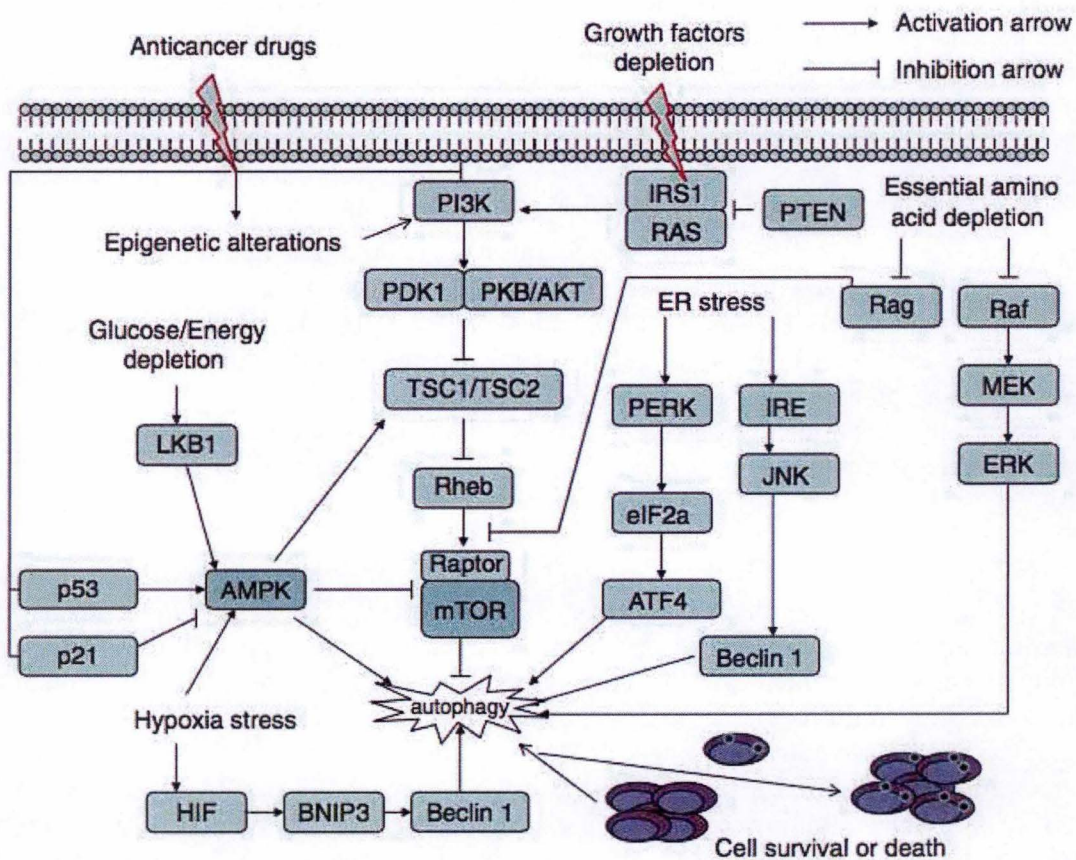
Des mutations spécifiques de *TP53* ont été associées à une résistance aux traitements chimiothérapeutiques dans certains cancers. Ce phénomène a pu être observé notamment chez des patientes atteintes d'un cancer des ovaires avec une mutation pour *TP53* et traitées au cisplatine ou au carboplatine (Reles et al., 2001).

### *2.3.5.4 Altérations de la voie PI3K/Akt*

La voie PI3K/Akt (phosphatidyl inositol 3 kinase/Akt) joue un rôle majeur dans la survie cellulaire et la résistance aux agents chimiothérapeutiques. PI3K, une kinase lipidique, est le plus souvent activée par le biais de récepteurs membranaires qui sont eux-mêmes stimulés par des signaux tels que des facteurs de croissance. Le recrutement de PI3K provoque la phosphorylation en cascade de nombreuses protéines intracellulaires pour aboutir à l'activation d'Akt. Akt activé régule à son tour des substrats impliqués dans la survie cellulaire, la progression du cycle cellulaire et la croissance cellulaire (Guerrero-Zotano et al., 2016) (Figure I.13).

Des mutations de cette voie de signalisation sont fréquentes dans le cancer, particulièrement dans le cancer du sein où environ 60 % des tumeurs présentent des altérations génétiques qui hyperactivent la voie PI3K/Akt. Par exemple, une inactivation ou une mutation de *PTEN*, gène codant pour un antagoniste cellulaire de PI3K, se produit fréquemment dans les tumeurs





**Figure I.14 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'autophagie.**

L'autophagie peut être activée en réponse à de multiples stress pendant la progression du cancer, y compris la privation de nutriments, le stress du réticulum endoplasmique, l'hypoxie, la déplétion en glucose/énergie, la chimiothérapie et d'autres stress. La voie AMPK/mTOR joue le rôle de canal central pour les voies de signalisation de l'autophagie, favorisant la survie cellulaire ou la mort si elle est prolongée (Sui et al., 2013).



à un stade avancé (deGraffenried et al., 2004). Le gène *PI3K* est lui-même souvent altéré dans plusieurs cancers humains. Ce gène se trouve sur le chromosome 3q26, une région fréquemment amplifiée, notamment dans les cancers de l'ovaire et du col utérin (Fresno Vara et al., 2004). Dans le cas des ccRCC, la voie PI3K/Akt est rarement mutée mais fortement activée. En effet, la perte de *VHL* induit une régulation positive de HIF qui favorise l'expression de divers facteurs de croissance, dont EGF, PDGF et VEGF. Ces facteurs de croissance peuvent activer à leur tour la voie PI3K/Akt. L'activation subséquente de mTOR favorise alors l'expression de HIF, formant ainsi une boucle de rétroaction positive entraînant une activation constitutive du réseau de signalisation (Guo et al., 2015). Une telle voie constitutivement active renforce l'insensibilité des cellules tumorales à l'induction de l'apoptose (Igney and Krammer, 2002).

### 2.3.5.5 L'autophagie

L'autophagie est une voie de dégradation lysosomale qui décompose les organites cellulaires et les protéines dans le but de recycler les métabolites et maintenir la biosynthèse cellulaire au cours des stress métaboliques. Dans le cas où cette tentative de survie cellulaire échoue, la cellule est alors dirigée vers l'apoptose (Holohan et al., 2013).

Diverses voies de signalisation ont été recensées pour être impliquées dans la régulation positive ou négative de l'autophagie. La voie PI3K/Akt/mTOR et celle de l'AMPK (AMP activated protein kinase) sont considérées comme des éléments centraux dans la régulation de l'autophagie. Lorsqu'activée par la voie PI3K/Akt, mTOR exerce un effet négatif sur l'autophagie. En revanche, AMPK peut stimuler l'autophagie directement ou indirectement en inhibant la signalisation de mTOR. Plusieurs suppresseurs de tumeurs connus tels que p53 et PTEN sont également capables de stimuler ou d'inhiber l'autophagie (Sui et al., 2013) (Figure I.14).

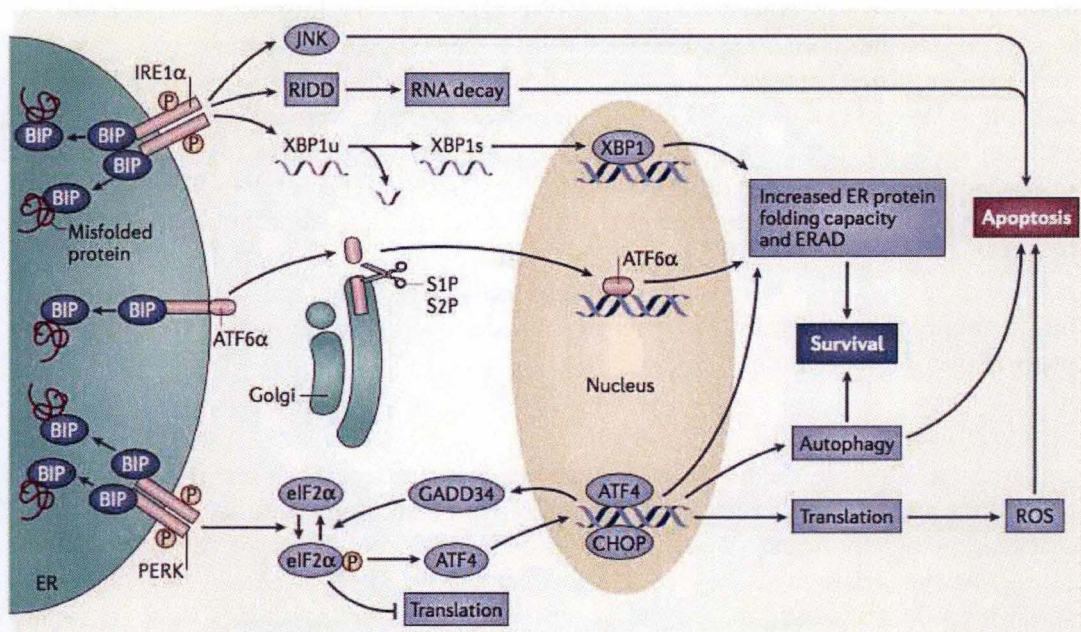
Comme expliqué dans les paragraphes précédents, des altérations dans les voies PI3K/Akt/mTOR, PTEN et p53 qui se produisent fréquemment dans divers cancers, peuvent déréguler le processus d'autophagie et ainsi favoriser la survie cellulaire face aux traitements anti-cancéreux (Gozuacik and Kimchi, 2004).

### 2.3.5.6 Altérations de la voie UPR

Etant donné que le cancer survient habituellement et progresse dans un microenvironnement stressant, les cellules transformées peuvent bénéficier de l'activation de l'UPR (unfolded protein response) pour survivre. De nombreuses conditions environnementales physiologiques et pathologiques perturbent le repliement des protéines du RE (réticulum endoplasmique) et provoquent l'accumulation de protéines mal conformées. Le RE est l'organite des cellules eucaryotes responsable de l'homéostasie calcique ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaire, de la biosynthèse lipidique, ainsi que du repliement et du transport des protéines. Le moindre stress provoqué par des altérations environnementales du RE peut mener à la perturbation du repliement des protéines et à une accumulation de protéines mal conformées. Cela a pour conséquence l'activation de l'UPR, une association de voies de signalisation qui collaborent pour maintenir un environnement productif de repliement de protéines au niveau du RE.

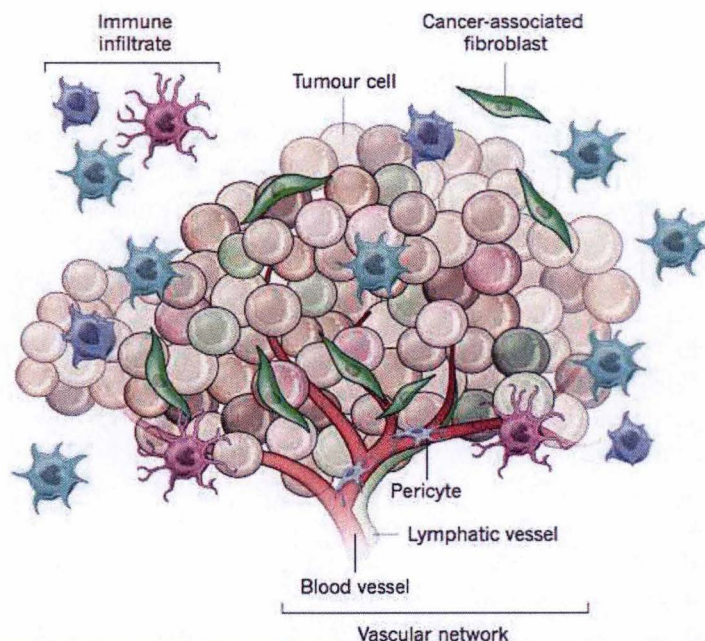
Lorsque les protéines sont mal repliées, deux événements clés se produisent. Premièrement, les protéines mal conformées lient et séquestrent BIP (binding immunoglobulin protein), une protéine chaperonne aussi appelée GRP78 (78 kDa Glucose-Regulated Protein) et HSP5 (heat shock protein 5). En second, la réduction du niveau de BIP induit l'activation de trois branches de signalisation parallèles: la voie PERK-eIF2 $\alpha$  (PRKR ER kinase - eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ ), la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 (inositol-requiring protein 1 $\alpha$  - X-box binding protein 1) et celle d'ATF6 $\alpha$  (activating transcription factor 6). L'activation de ces trois voies induit des cascades de signalisation qui mènent *in fine* à promouvoir la survie





**Figure I.15 : Les voies de signalisation de l'UPR.**

Suite à un stress du RE (réticulum endoplasmique), les protéines mal repliées se lient et séquestrent la protéine BIP (binding immunoglobulin protein), activant ainsi l'UPR (unfolded protein response). L'UPR comprend trois branches de signalisation parallèles : la voie PERK-eIF2α (PRKR ER kinase - eukaryotic translation initiation factor 2α), la voie IRE1α-XBP1 (inositol-requiring protein 1α - X-box binding protein 1) et celle d'ATF6α (activating transcription factor 6). Le résultat de l'activation de l'UPR augmente le repliement des protéines, le transport et la dégradation des protéines associées au RE (ERAD), tout en atténuant la synthèse des protéines. Si le problème de repliement des protéines n'est pas résolu, les cellules entrent en apoptose (Wang and Kaufman, 2014).



**Figure I.16 : Composition cellulaire du microenvironnement tumoral.**

La formation de tumeurs implique la co-évolution des cellules néoplasiques avec son microenvironnement. Celui-ci est composé de la matrice extracellulaire, des cellules endothéliales vasculaires, stromales et immunitaires (Junttila and de Sauvage, 2013).



cellulaire via une atténuation transitoire de la synthèse protéique, une capacité accrue de trafic de protéines à travers le RE et une augmentation des voies de dégradation protéique par le RE appelée ERAD (ER-associated protein degradation), ainsi que de l'autophagie. Si ces mécanismes adaptatifs ne peuvent pas résoudre le défaut de repliement des protéines, les cellules entrent en apoptose (Wang and Kaufman, 2014) (Figure I.15).

Le stress du RE et l'activation de l'UPR ont tout deux été recensés comme étant impliqués dans de nombreux types de cancers et dans leur développement. L'activation de l'UPR dans les cellules malignes est attribuée à la fois aux facteurs intrinsèques et aux facteurs extrinsèques. Les facteurs intrinsèques sont issus de l'hyperactivation d'oncogènes ou des mutations de gènes suppresseurs de tumeur qui induisent une augmentation de la synthèse protéique et leur translocation dans le RE en raison de la forte demande métabolique au cours de la transformation oncogénique. Outre les facteurs intrinsèques, les cellules cancéreuses rencontrent fréquemment un environnement hostile qui perturbe le repliement des protéines du RE et active l'UPR. Par conséquent, l'UPR est activé pour augmenter la capacité de repliement des protéines. Par exemple, une corrélation entre l'activation de BIP et le stade de la tumeur a été établie dans les cancers rénaux. L'activation accrue de BIP entraîne une augmentation de l'agressivité, de la taille et du potentiel d'invasion de la tumeur (Wang and Kaufman, 2014).

### 2.3.6 Le microenvironnement tumoral

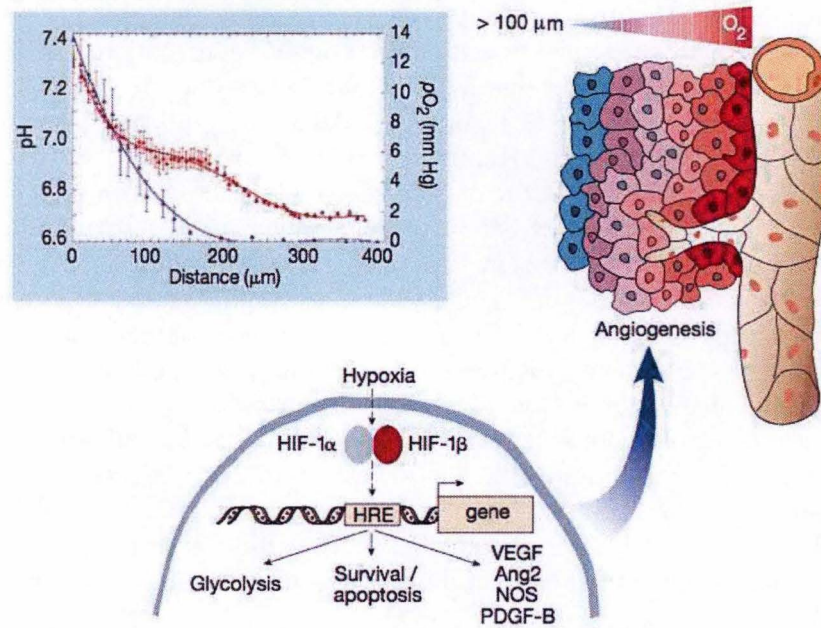
Comme mentionné à plusieurs reprises, l'environnement influence considérablement l'évolution des cellules cancéreuses. Les premières thérapies anti-cancéreuses se sont principalement concentrées sur le ciblage des cellules cancéreuses. Cependant, des découvertes durant les dernières décennies ont démontré l'intérêt d'étudier une tumeur en tenant également compte de son microenvironnement. Ce nouveau concept considère que les cellules cancéreuses n'agissent pas seules mais interagissent avec le stroma et collaborent avec des types cellulaires non-cancéreux au développement tumoral (Hanahan and Coussens, 2012). Le microenvironnement tumoral se compose généralement du stroma, de fibroblastes associés au cancer, de cellules immunitaires et inflammatoires ainsi que de vaisseaux sanguins (Holohan et al., 2013) (Figure I.16). Ces composantes résidant dans le microenvironnement tumoral influencent non seulement la prolifération des cellules cancéreuses et la formation de métastases, mais sont également capables de modifier la réponse des tumeurs aux agents chimiothérapeutiques (McMillin et al., 2013).

Une étude effectuée sur le rôle des cellules stromales dans la résistance aux médicaments a montré que lorsque les cellules de mélanomes sont co-cultivées avec des cellules fibroblastiques, elles développent une résistance aux inhibiteurs de B-Raf qui est une kinase impliquée dans la croissance cellulaire (Housman et al., 2014; Straussman et al., 2012).

Une autre étude effectuée sur les TAMs (tumor associated macrophages) a mis en évidence l'association des cellules immunitaires innées dans la progression des tumeurs malignes. Ces expériences montrent que ces macrophages sont capables de fournir des protéases telles que les cathepsines B et S aux cellules cancéreuses pour promouvoir la croissance tumorale et la formation de métastases (Gocheva et al., 2010; Quail and Joyce, 2013).

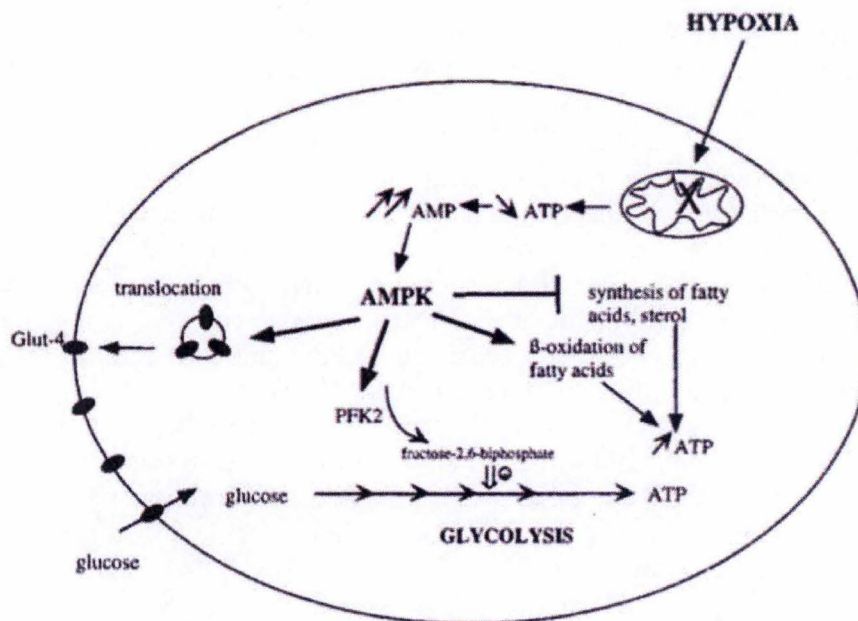
D'autres conditions environnementales avec des variations régionales au sein de la tumeur telles que l'hypoxie, l'acidité et la présence de facteurs de croissance existent dans une tumeur et façonnent activement son développement (Junttila and de Sauvage, 2013). Elles peuvent même contribuer au rôle de protection permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose et de développer une résistance. Une condition bien connue pour la protection qu'elle confère aux cellules face aux agents chimiothérapeutiques et qui sera étudiée dans le cadre de ce mémoire est l'hypoxie.





**Figure I.17 : Hypoxie tumorale.**

A cause de l'irrégularité et structurelle et fonctionnelle de la microcirculation tumorale, certaines cellules tumorales sont localisées à une distance supérieure à 100  $\mu\text{m}$ . Cette distance représente la limite de la diffusion de l'oxygène des vaisseaux sanguins. A une plus grande distance, les cellules deviennent hypoxiques. Dans ces conditions, le facteur de transcription HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) augmente la transcription de gènes qui permettent l'angiogénèse, un métabolisme glycolytique et la survie cellulaire. Le graphe montre la relation entre la distance des cellules tumorales des vaisseaux sanguins et les plus proches et le degré d'hypoxie (bleu) ou d'acidose (rouge) (Carmeliet and Jain, 2000).



**Figure I.18 : Représentation des réponses adaptatives à l'hypoxie.**

L'AMPK (AMP kinase), senseur principal de la charge d'énergie cellulaire, joue un rôle majeur dans la régulation de l'équilibre entre les voies cataboliques et anaboliques (Michiels, 2004).



### 3 Hypoxie et résistance aux agents anti-cancéreux

#### 3.1 Hypoxie tumorale

L'hypoxie est définie comme étant un apport inadéquat d'oxygène ( $O_2$ ) aux tissus de l'organisme, compromettant les fonctions biologiques au sein des tissus. Elle peut être induite par différents facteurs aussi bien physiologiques que pathologiques (Hockel and Vaupel, 2001).

Dans le cas du cancer, l'hypoxie tumorale est principalement une conséquence de la perturbation structurelle et fonctionnelle de la microcirculation qui mène à des difficultés de diffusion d'oxygène. Cela résulte en la présence de zones avec des pressions partielles d'oxygène très faibles (jusqu'à zéro) au sein des tumeurs, qui peuvent se manifester de façon soit transitoire soit chronique (Hockel and Vaupel, 2001). L'hypoxie transitoire, aussi appelée intermittente ou cyclique, est observée lors de flux sanguins irréguliers dans les tumeurs. Les cellules tumorales se retrouvent donc dans des phases d'hypoxie puis de réoxygénation qui provoquent des changements transitoires. Quant à l'hypoxie chronique, elle résulte de la limitation de la diffusion de l'oxygène. L'oxygène diffuse à une distance de 100-150  $\mu m$  des vaisseaux sanguins dans les tissus normaux et malins. À une plus grande distance, la tension d'oxygène devient proche de zéro et les cellules deviennent hypoxiques (Toffoli and Michiels, 2008) (Figure I.17).

Dans les deux cas, les changements systémiques de niveau d'oxygénation sont très rapidement perçus par des chémorécepteurs cellulaires spécialisés mais également par toutes les cellules nucléées, activant ainsi différents systèmes en réponse à l'hypoxie. Dans les secondes à minutes qui suivent, des adaptations systémiques telles que l'hyperventilation pulmonaire et la vasodilatation sont mises en place pour optimiser l'apport d'oxygène aux tissus. Au niveau cellulaire, les cellules subissent un switch métabolique leur permettant de passer d'un métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie afin de maintenir une production suffisante en ATP, élément crucial à l'équilibre ionique et osmotique cellulaire. En présence d'une quantité suffisante de glucose, la glycolyse peut subvenir à la production d'ATP grâce à l'augmentation de l'activité d'enzymes glycolytiques telles que la PFK (phosphofructokinase). Le fructose-2,6-biphosphate, activateur allostérique majeur de la PFK, est synthétisé par la PFK2, qui est elle-même régulée par phosphorylation via l'AMPK. À plus long terme, cette réponse adaptative à l'hypoxie est orchestrée par une famille de facteurs de transcription induite par l'hypoxie dont le membre le plus important et le plus étudié est HIF-1, le facteur 1 inductible par l'hypoxie (Michiels, 2004) (Figure I.18).

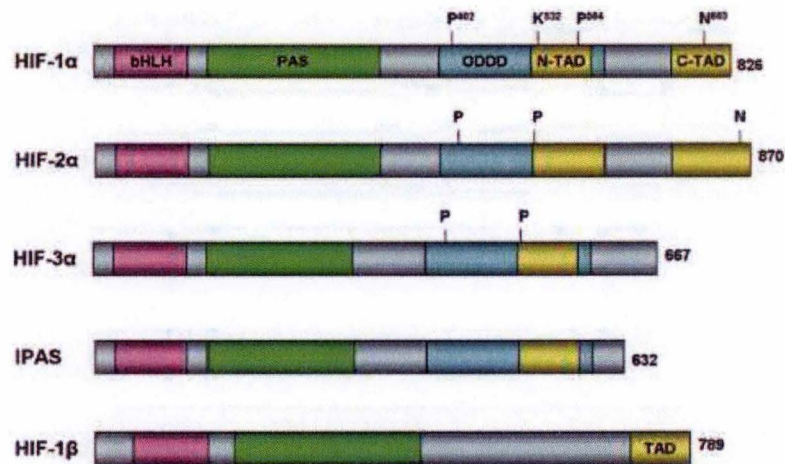
#### 3.2 HIF-1

##### 3.2.1 Caractéristiques et structure

HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) est un facteur de transcription qui a été découvert en 1992 lors d'investigations effectuées sur la régulation hypoxique de l'expression de l'érythropoïétine (EPO), une hormone qui stimule la production des érythrocytes. Les chercheurs ont identifié une séquence HRE (hypoxia response element) dans le gène de l'EPO sur laquelle HIF-1 vient se lier en conditions hypoxiques (Ke and Costa, 2006; Semenza and Wang, 1992).

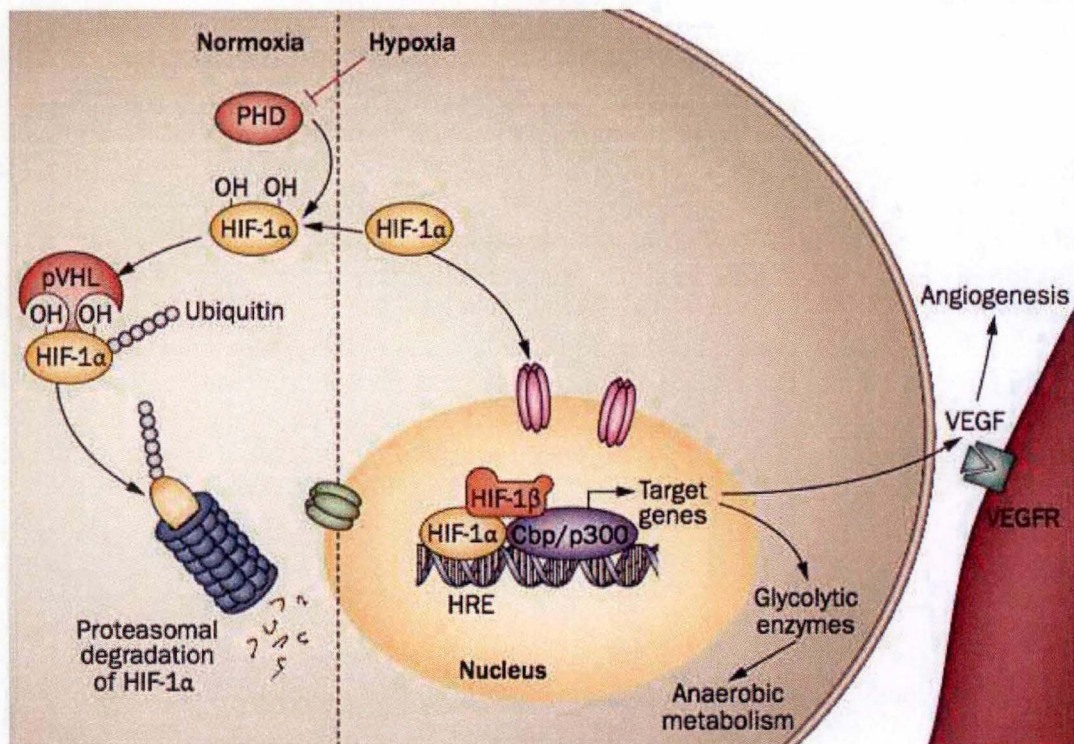
Les facteurs de transcription HIF se liant à la séquence HRE sont dimériques et contiennent une sous-unité de la famille  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  ou HIF-3 $\alpha$ ) ainsi qu'un membre de la famille





**Figure I.19 : Structure des sous-unités HIF-α et HIF-1β.**

HIF-α (HIF-1α, HIF-2α, HIF-3α et IPAS) et HIF-1β appartiennent à la famille des protéines bHLH (basic helix-loop-helix) et PAS (PER-ARNT-SIM). HIF-α possède un domaine ODD (oxygen dependant degradation) qui est responsable de sa stabilité dépendante de l'oxygène via l'hydroxylation de deux résidus proline (P) et l'acétylation d'une lysine (K). Les résidus proline sont conservés chez HIF-2α et HIF-3α. HIF-1α et HIF-2α contiennent deux domaines de transactivation, C-TAD et N-TAD, alors qu'HIF-1β n'en contient qu'un. Le nombre total d'acides aminés de chaque sous-unité est noté à la fin chaque structure (Ke and Costa, 2006).



**Figure I.20 : La voie HIF-1α.**

En normoxie, les senseurs d'oxygène cellulaire (PHD) hydroxylent les résidus proline spécifiques (Pro402 et Pro564) de HIF-1α, ce qui conduit à sa dégradation protéasomale médiée par pVHL (Von Hippel-Lindau protein), une ligase de l'ubiquitine E3. En hypoxie, HIF-1α n'est ni ubiquitinylé ni dégradé. Il se dimérise alors avec HIF-1β pour former HIF-1 qui agit comme un facteur de transcription en se liant à la séquence HRE (hypoxia response element) pour induire l'expression de divers gènes cibles. Parmi ces gènes se trouve le VEGF (vascular endothelial growth factor) qui favorise l'angiogenèse et les gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie (Maes et al., 2012).



$\beta$  (HIF-1 $\beta$  ou HIF-2 $\beta$ ). HIF-1 $\alpha$  est exprimée de manière ubiquiste dans les tissus alors que l'expression de HIF-2 $\alpha$  est restreinte dans des tissus spécifiques comme dans les vaisseaux sanguins et les poumons (Ke and Costa, 2006).

HIF-1 est un hétérodimère constitué des deux sous-unités HIF-1 $\alpha$  (120 kDa) et HIF-1 $\beta$  (94 kDa). Ces sous-unités appartiennent à la famille des bHLH-PAS (basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM). Les motifs HLH et PAS sont nécessaires à la dimérisation des sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  tandis que la partie basique du motif bHLH permet leur liaison à la séquence HRE de l'ADN. De plus, HIF-1 $\alpha$  contient deux domaines de transactivation dans la moitié C-terminale : N-TAD et C-TAD. Il a été montré que le C-TAD interagit en particulier avec des co-activateurs tels que CBP/p300 pour activer la transcription génique. HIF-1 $\alpha$  contient également un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène. Bien que HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  soient exprimés de manière constitutive, la formation du facteur de transcription HIF-1 dans le noyau dépend de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , régulée principalement par des mécanismes dépendant de l'oxygène (Harris, 2002; Ke and Costa, 2006) (Figure I.19).

### 3.2.2 Régulation de HIF-1

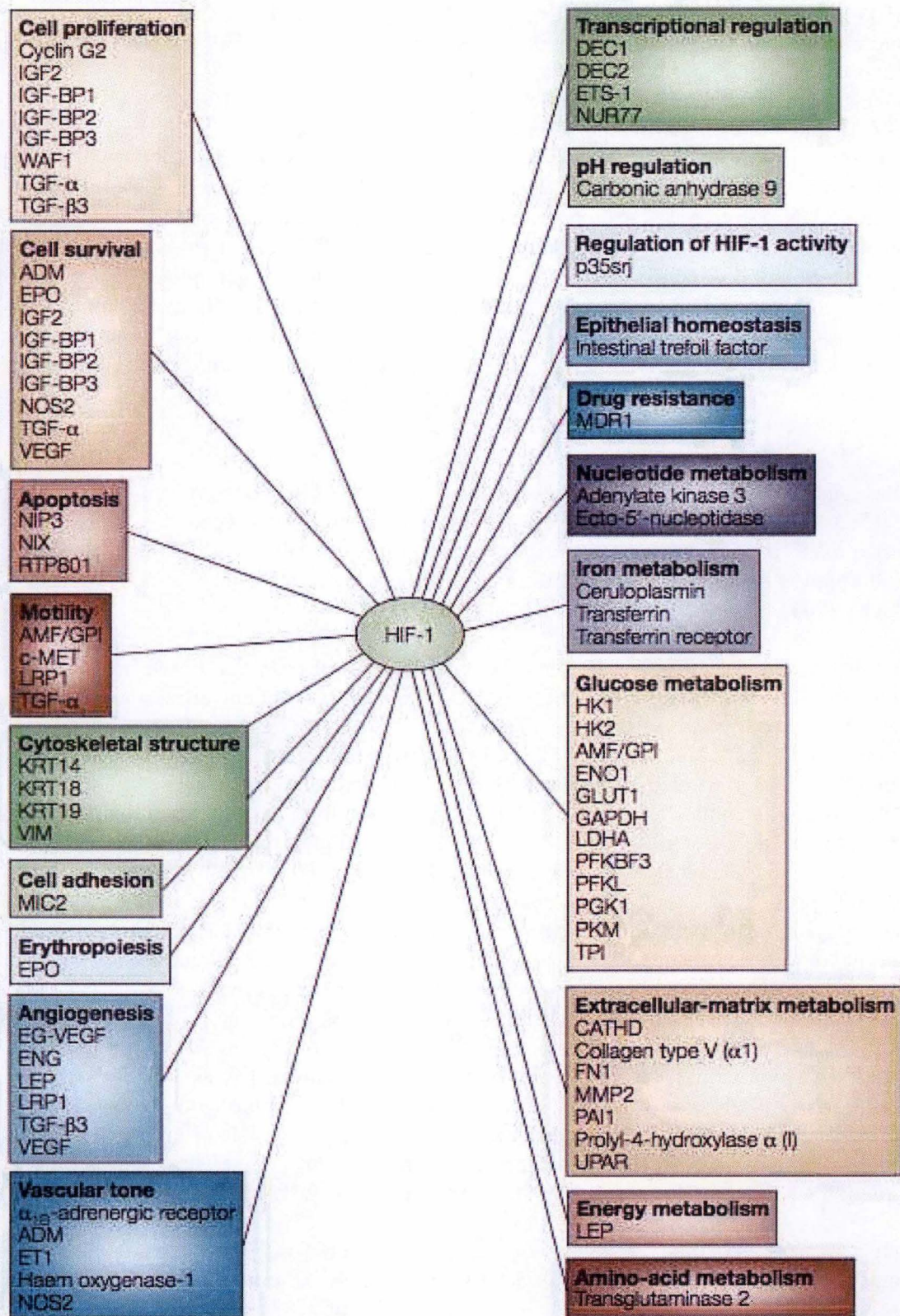
Quelles que soient les conditions, les taux d'ARNm de HIF-1 $\alpha$  sont constants. C'est la stabilité et l'activité de la protéine qui varient en fonction du niveau d'oxygène par des modifications post-traductionnelles telles que l'hydroxylation, l'ubiquitination et la phosphorylation, qui ont lieu dans différents domaines de la protéine (Ke and Costa, 2006; Michiels, 2004).

En normoxie, HIF-1 $\alpha$  est polyubiquitinylé et ciblé pour la dégradation par le protéasome. Le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène de HIF-1 $\alpha$  contient un domaine de liaison hautement conservé pour la protéine pVHL (Michiels, 2004). Cette protéine remplit diverses fonctions, notamment dans la régulation de l'apoptose, le contrôle de la sénescence cellulaire, la régulation transcriptionnelle, l'organisation de la matrice extracellulaire et la stabilité des microtubules. Plus important encore, pVHL est un membre d'un complexe E3-ubiquitine ligase (composé de l'élongine C, l'élongine B, la culline-2 et Rbx 1) qui cible les sous-unités HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  (Kaelin, 2008). En présence d'oxygène, HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé au niveau des résidus proline 402 et 564 du domaine de dégradation dépendant de l'oxygène par des PHDs (prolyl hydroxylases), des enzymes dites senseurs d'oxygène. Ces PHDs font partie de la famille des dioxygénases dépendant du 2-oxoglutarate et nécessitent l'oxygène, le fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ainsi que l'ascorbate comme co-facteurs pour exercer leur activité. L'hydroxylation des résidus proline par les PHDs déclenchent la liaison et l'ubiquitination de HIF-1 $\alpha$  par pVHL, menant à sa dégradation par le protéasome.

En conditions hypoxiques, les PHDs sont inactives et ne peuvent pas hydroxyler HIF-1 $\alpha$ . La stabilisation et l'accumulation de HIF-1 $\alpha$  lui permettent de se déplacer du cytoplasme vers le noyau pour se lier à HIF-1 $\beta$  et former le dimère actif HIF-1. La liaison de ce complexe aux séquences HRE de l'ADN entraîne la transcription d'un large panel de gènes requis pour l'adaptation à l'hypoxie (Ke and Costa, 2006; Schödel et al., 2015) (Figure I.20).

De plus, il semblerait que la stabilisation et/ou la synthèse de HIF-1 $\alpha$  en hypoxie soient également dépendantes de la voie PI3K/Akt mais aussi d'autres facteurs tels que des conditions redox adéquates, une dissociation de la protéine chaperonne HSP90, une association avec des co-activateurs comme CBP/p300 ou SRC-1 ainsi qu'une phosphorylation pour une activité transcriptionnelle complète. Dans des conditions non hypoxiques, les facteurs de croissance, les cytokines et d'autres molécules de signalisation ont tendance à provoquer une accumulation de la protéine HIF-1 $\alpha$  dans les cellules via l'activation des voies PI3K/Akt et des MAPK (mitogen-activated protein kinases) (Masoud, 2015; Michiels, 2004).





**Figure I.21 : Gènes transcriptionnellement activés par HIF-1.**

Plus de 60 gènes cibles directs putatifs de HIF-1 ont été recensés. Ces gènes codent principalement pour des protéines impliquées dans des processus clés de l'adaptation des cellules aux conditions hypoxiques (Semenza, 2003).



### 3.2.3 Cibles de HIF-1

Plus de 60 gènes cibles directs putatifs de HIF-1 ont été recensés. Ces gènes codent principalement pour des protéines impliquées dans des processus clés de l'adaptation des cellules aux conditions hypoxiques tels que l'angiogenèse, le passage à un métabolisme anaérobie et le transport de l'oxygène. Par exemple, HIF-1 active la transcription des récepteurs de la transferrine et de l'EPO pour favoriser la production d'érythrocytes. Elle permet également de promouvoir l'angiogenèse en activant la transcription des gènes codant pour VEGF et PDGF afin d'améliorer la vascularisation. HIF-1 est capable d'induire le switch métabolique par activation de la transcription des enzymes glycolytiques telles la PGK1 (phosphoglycérate kinase 1), la PKM (pyruvate kinase M), la PFK, l'aldolase A, la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), l'énolase 1, mais aussi les transporteurs de glucose Glut-1 et Glut-4 (Michiels, 2004; Semenza, 2003) (Figure I.21).

Cependant, de nombreux gènes cibles de HIF-1 activés pour l'adaptation au microenvironnement tumoral hypoxique, y compris ceux cités plus haut, favorisent la progression tumorale vers un phénotype agressif des cellules cancéreuses, et induisent de plus une résistance aux agents chimiothérapeutiques (Cosse and Michiels, 2008).

Comme mentionné auparavant, la surexpression des pompes à efflux telles que MDR1 est fréquemment observée dans les cellules cancéreuses. L'hypoxie tumorale renforce d'autant plus ce mécanisme de résistance en augmentant la transcription du gène *MDR1*. Une étude a montré la présence d'une séquence HRE au sein du promoteur du gène *MDR-1*, augmentant ainsi l'abondance de ces pompes à efflux en conditions hypoxiques (Comerford et al., 2002; Cosse and Michiels, 2008).

L'hypoxie est capable de réguler la prolifération de deux manières opposées. D'une part, elle peut augmenter la prolifération des cellules en surexprimant des facteurs de croissance comme les IGF (insulin-like growth factor) et ainsi promouvoir la croissance tumorale (Semenza, 2003). D'autre part, elle induit le ralentissement du cycle cellulaire en inhibant l'expression de c-Myc, un pro-oncogène impliqué dans l'expression de plusieurs cyclines et dans la répression de régulateurs négatifs du cycle cellulaire. De plus, l'hypoxie inhibe la voie PI3K-Akt/mTOR via l'expression de Redd1. Ainsi, la diminution de la prolifération des cellules cancéreuses nuit à l'efficacité des agents chimiothérapeutiques qui opèrent plus efficacement sur des cellules en prolifération plutôt qu'en quiescence (Cosse and Michiels, 2008).

Il semblerait que l'hypoxie joue un rôle dual dans la régulation de l'apoptose en promouvant à la fois des facteurs pro- et anti-apoptotiques, mais également par la régulation de p53. Dans les deux cas, l'hypoxie contribue à la croissance tumorale. L'inhibition de l'apoptose permet aux cellules cancéreuses de survivre, mais l'activation de l'apoptose par l'hypoxie renforce elle aussi l'agressivité de la tumeur, notamment en exerçant une pression de sélection pour avantager les cellules mutées pour p53 avec des défaillances au niveau de l'apoptose (Cosse and Michiels, 2008; Van Meir, 1996) (Tableau I.1).

L'instabilité génomique est connue comme étant une caractéristique majeure responsable de la transformation d'une cellule normale en cellule maligne (Hanahan and Weinberg, 2000). L'hypoxie peut contribuer à cette instabilité en réprimant les mécanismes de réparation à l'ADN comme le MMR (mismatch repair) et la recombinaison homologue (Bindra et al., 2007), mais aussi en induisant des mutations ou réarrangements chromosomiques dans des conditions hypoxiques sévères (Cosse and Michiels, 2008; Hockel and Vaupel, 2001; Ruan et al., 2009).

La formation de métastases et l'invasion tumorale constituent un processus en plusieurs étapes comprenant la disruption des interactions avec les cellules environnantes et du microenvironnement, l'invasion de la matrice extra-cellulaire, l'intravasation et



**Tableau I.1 : Liste des protéines appartenant à la famille Bcl-2 en réponse à l'hypoxie (Cosse and Michiels, 2008).**

Protein	regulation	HIF-1-dependent	Apoptosis	Cell line	Inducers	pO <sub>2</sub>	Ref.
Bax	↓ translocation	no	down	HTC116	TRAIL	1%	[28]
Bax	↓ expression	yes	down	HTC116, HT29, SW480	etoposide/oxaliplatin	1% and <0.1%	[23]
Bax	↓ expression	yes	down	SGC7901	vincristine	1%	[84]
Bax	↓ expression	?	down	HepG2	etoposide	1%	[21]
Bax	↓ expression	yes	down	OSC-1	/	1%	[25]
Bak	↓ expression	yes	down	OSC-1	/	1%	[25]
Bak	↓ expression	?	down	HepG2	etoposide	1%	[21]
Bcl-2	↑ expression	?	down	A549	TRAIL	1%	[24]
Bcl-2	↑ expression	yes	down	SGC7901	vincristine	1%	[84]
Bcl-2	↑ expression	no	down	A204 RMS, A263 ES	Doxorubicin, Vincristine, actinomycin D, TRAIL	<1%	[26]
Bcl-XL	↑ expression	?	down	A549	TRAIL	1%	[24]
Bid	↓ expression	yes	down	HTC116, HT29, SW480	etoposide/oxaliplatin	1% and <0.1%	[23]
BNIP3	↑ expression	yes	up	SKBr, T47D, MDA468, MCF-7, MDA231, SKOV3, HT1080, MKN45, C32, LS174T, EJ, RZM, HUVEC	/	0.1%	[29]
BNIP3L	↑ expression	?	up	SKBr, T47D, MDA468, MCF-7, MDA231, SKOV3, HT1080, MKN45, C32, LS174T, EJ, RZM, HUVEC	/	0.1%	[29]
Mcl-1	↑ expression	yes	down	HepG2	t-BHP	1%	[22]
PUMA	↑ expression	yes	up	SK-N-MC, Saos-2, H719	/	0.5%	[28]



l'extravasation de la circulation sanguine vers le nouveau tissu d'implantation (Cosse and Michiels, 2008). L'hypoxie contribue à favoriser la formation de métastases. Par exemple, l'activation de HIF-1 peut induire l'expression de TWIST, un facteur de transcription capable d'inhiber l'expression de l'E-cadhérine, ce qui engendre la transition épithélio-mésenchymateuse (Yang et al., 2004). De cette façon, l'hypoxie contribue à développer le processus causant le plus de mortalités chez les patients atteints d'un cancer (Ruan et al., 2009).

Outre par le biais des gènes cibles directs de HIF-1, l'hypoxie est également capable d'avoir un impact direct sur des processus cellulaires. L'hypoxie active la voie UPR et ainsi favorise la survie et la croissance cellulaire. Ce microenvironnement peut avoir un impact direct sur la modification des protéines dans le RE, conduisant à l'accumulation de protéines mal conformées ou dépliées. Par exemple, une modification post-traductionnelle majeure qui peut se produire sur les protéines synthétisées dans le RE est la formation de liaisons disulfures. Ces liaisons sont catalysées par des disulfures isomérases dépendantes du niveau d'oxygène. Il semblerait que l'hypoxie augmente également la stabilité de certains composants de l'UPR, comme l'activation d'ATF4 (activating transcription factor 4) et ainsi favorise la survie cellulaire. De plus, la privation de glucose souvent associée à l'hypoxie perturbe également le repliement des protéines. Etant donné que le glucose est principalement utilisé pour fournir de l'ATP à la cellule, cette pénurie de glucose entraîne une perturbation de l'homéostasie RE- $\text{Ca}^{2+}$  et un mauvais repliement des protéines causé par une glycosylation inappropriée des protéines (Wang and Kaufman, 2014). Ces effets directs de l'hypoxie, indépendants de l'activation de HIF-1, favorisent également la survie des cellules cancéreuses.

### 3.2.4 Mutation de pVHL dans les ccRCC

L'inactivation de *VHL* est un événement primaire dans la carcinogenèse des ccRCC et constitue leur caractéristique principale. Les altérations fonctionnelles de *VHL* se produisent généralement par perte d'hétérozygotie, de mutations ou plus rarement de mécanismes épigénétiques tels que la méthylation du promoteur (Banks et al., 2006). Cependant, la perte de *VHL* seule est insuffisante pour provoquer le ccRCC comme en témoigne l'absence de tumorigenèse rénale chez les souris déficientes pour *VHL*, suggérant que d'autres mutations génétiques et/ou des modifications épigénétiques sont nécessaires (Creighton et al., 2013; Kapitsinou and Haase, 2008).

Des analyses génétiques et immunohistochimiques des cellules provenant de ccRCC montrent une surexpression de HIF-1 et de ses gènes cibles (Kim and Kaelin, 2004). Les mutations de pVHL empêchent sa liaison à HIF-1 $\alpha$  et la dégradation de cette dernière par le protéasome. Cette stabilisation de HIF-1 mène à l'expression constitutive du facteur de transcription et de ses gènes cibles. Ces cellules sont alors constamment dans un état de « pseudo-hypoxie ». Pour cette raison, les ccRCC sont associés à un phénotype tumoral agressif et sont responsables de la majorité des décès dans les cancers du rein (Hsieh et al., 2017). Il n'est dès lors pas étonnant que les principaux traitements utilisés pour traiter ces cancers ciblent l'angiogenèse, vu le caractère très vascularisé des tumeurs dans les ccRCC.

## 4 TMEM45A

### 4.1 Caractéristiques de TMEM45A

L'hypoxie tumorale est souvent associée à une probabilité accrue de récurrence tumorale et de décès. En effet, un microenvironnement hypoxique induit des modifications de l'expression



génique favorisant la survie et l'agressivité des cellules cancéreuses mais confère également une chimiorésistance aux thérapies. Les mécanismes sous-jacents et les voies biologiques restent flous mais plusieurs gènes, dont l'expression change en cas de normoxie ou d'hypoxie ainsi qu'en présence ou en absence de médicament chimiothérapeutique, ont été identifiés. Parmi cette liste figure *TMEM45A*, une protéine transmembranaire associée à l'appareil de Golgi (Flamant et al., 2012).

*TMEM45A*, également appelée DERP7 (dermal papilla-derived protein 7) ou DNAPTP4 (DNA polymerase-transactivated protein 4), fait partie de la famille *TMEM45* aussi nommée famille de fonction inconnue DUF716 (Interpro). Cette famille est composée de trois protéines transmembranaires hypothétiques non caractérisées et exprimées uniquement chez les eucaryotes. Les deux autres membres sont *TMEM45B* et *TEDDM1* (transmembrane epididymal protein 1) (Uniprot).

Le gène *TMEM45A* situé sur le chromosome 3q12.2 code pour 7 transcrits différents dont trois codent pour des protéines, contenant, 191, 275 et 291 acides aminés, avec un poids moléculaire de 21,9 , 31,7 et 33,5 kDa respectivement. La protéine possède 3, 5 ou 7 hélices transmembranaires prédites ainsi qu'un domaine pfam DUF716, associé à la famille des protéines *TMEM45*. Le gène est conservé parmi les espèces étant donné qu'il possède 94 orthologues (Ensembl).

*TMEM45A* possède des sites prédits d'ubiquitination au niveau des résidus lysine 43 et lysine 263, ainsi que des sites prédits de phosphorylation au niveau des résidus sérine 256, 257 et 271 (Phosphosite).

Des analyses montrent que l'ARNm de *TMEM45A* est fortement exprimé dans la peau, les adipocytes, le muscle lisse et le placenta (BioGPS). La protéine *TMEM45A* a d'ailleurs été mentionnée comme étant fortement exprimée dans les kératinocytes épidermiques, suggérant son implication dans la différenciation épidermique et la kératinisation (Flamant et al., 2012; Hayez et al., 2014, 2016).

A ce jour, peu d'études sont effectuées sur *TMEM45A* et les seules informations disponibles proviennent de bases de données, d'outils bio-informatiques ou d'études transcriptomiques. Toutefois, des études récentes ouvrent des pistes quant aux fonctions de cette protéine, notamment sur son implication dans divers cancers.

### 4.2 *TMEM45A* et les cancers

Dans plusieurs études, *TMEM45A* a été identifié comme un gène cible de HIF-1 dont l'expression est la plus augmentée dans différents types cellulaires incubés en hypoxie (Benita et al., 2009; Flamant et al., 2012; Martin-Rendon et al., 2007; Nissou et al., 2013).

Ce n'est que récemment que ce gène a été associé à la chimiorésistance induite par l'hypoxie dans le cancer. Une étude menée par Flamant et al. (2012) a montré la perte de résistance au paclitaxel et à l'étoposide respectivement dans ces cellules cancéreuses issues d'un carcinome hépatocellulaire (HepG2) et d'un d'adénocarcinome du sein (MDA-MB-231) incubées en hypoxie, suite à l'inactivation de *TMEM45A* par des siARN (small interfering RNA). De plus, cette étude a mis en évidence une corrélation entre le taux de survie des patientes atteintes de cancer du sein et l'expression de *TMEM45A*. Les patientes exprimant de manière importante *TMEM45A* ont un taux de survie plus faible que celles l'exprimant plus faiblement.

*TMEM45A* pourrait également avoir un rôle dans l'invasion tumorale, comme le montre une étude effectuée dans le carcinome ductal, un cancer du sein précurseur des cancers du sein invasifs (Lee et al., 2012).



Dans le cancer de la vessie, une surexpression de TMEM45A a été observée chez les patients atteints de ce cancer comparés aux personnes saines. Cette étude a permis de considérer TMEM45A comme biomarqueur pour détecter les cancers de la vessie (Urquidi et al., 2012). En outre, il a été suggéré que TMEM45A pourrait fonctionner comme un oncogène pour le cancer de l'ovaire, en raison de la suppression de la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire et la réduction de l'invasion cellulaire dans les cellules cancéreuses, lors de son invalidation par des shARN (short hairpin RNA) (Guo et al., 2015b). Des effets similaires ont été rapportés dans les cellules de gliome (Sun et al., 2015).

En ce qui concerne le cancer du rein, il a été montré que TMEM45A est surexprimée dans le ccRCC de haut stade (Thibodeau et al., 2016; Wrzesiński et al., 2015). Afin d'identifier les gènes les plus liés à la progression des ccRCC, des gènes différentiellement exprimés dans les tissus cancéreux comparés à des tissus sains ont été analysés. 930 gènes ont été recensés et parmi ceux-ci, les gènes dont l'expression montre la plus grande amplitude de changement dans un stade précoce de ccRCC comparé à stade avancé ont été retenus. Cela a abouti à l'identification de 143 gènes, avec *TMEM45A* en tête de liste (Thibodeau et al., 2016). Ces résultats montrent bien l'importance de la voie de signalisation de HIF-1 $\alpha$  dans les ccRCC. La perte du suppresseur de tumeur pVHL, caractéristique majeure des ccRCC, induit l'expression stable de HIF-1 $\alpha$  et permet l'expression constitutive de ses gènes cibles comme *TMEM45A*.



## 5 Objectifs du mémoire

Bien que le traitement de certains cancers par la chimiothérapie mène à une rémission, de nombreux patients développent une résistance aux agents chimiothérapeutiques entraînant généralement un mauvais pronostic. Il est dès lors primordial de découvrir les mécanismes impliqués dans la chimiorésistance. Des avancées à ce niveau permettraient de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux traitements plus efficaces.

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre de la thèse de Kathleen Schmit dont le but est d'étudier le rôle de TMEM45A dans la chimiorésistance et d'identifier par quels mécanismes cette protéine agit. Afin de sélectionner un type de cancer relevant autre que le cancer du sein et le cancer hépatique, déjà investigués par Flamant et al. (2012), un screen du niveau d'expression de TMEM45A dans différents cancers a été effectué en collaboration avec la biobanque du CHU UCL Namur. Il en est ressorti que l'expression de la protéine était augmentée dans des tissus cancéreux provenant du cancer tête et cou et du cancer rénal. Au vu des mutations relevées dans le cancer rénal et de leur impact sur l'expression de gènes cibles induite par l'hypoxie, l'étude de la fonction de TMEM45A s'est portée sur ce type de cancer durant ce mémoire. De plus, la surexpression de TMEM45A dans le RCC a été confirmée par une étude antérieure réalisée dans notre laboratoire. Des échantillons de tissus sains et tumoraux ont été prélevés chez 16 patients. Dans ce panel, 12 échantillons des tissus tumoraux surexprimaient TMEM45A par rapport aux échantillons de tissus sains correspondants.

Par conséquent, le but principal de ce mémoire est d'investiguer le rôle de TMEM45A dans la protection conférée par l'hypoxie contre les effets des agents chimiothérapeutiques dans des cellules issues du RCC.

La première partie de ce travail a consisté à invalider l'expression de *TMEM45A* par l'interférence de shARN. L'introduction de shARN spécifique à la séquence de l'ARNm cible dans les cellules permet une invalidation stable et à long terme du gène cible. Afin d'évaluer l'efficacité de cette invalidation, les niveaux d'expression d'ARNm et de protéines ont été analysés par RT-qPCR et par marquages en immunofluorescence respectivement. Ces marquages ont également permis de localiser la protéine au sein des cellules. Des analyses du phénotype des cellules contrôles et des cellules invalidées pour *TMEM45A* ont ensuite été faites par des observations de morphologie et par des évaluations du taux de prolifération des cellules. Pour étudier la sensibilité des cellules à un agent chimiothérapeutique, des tests de MTT, LDH et des western blots permettant de mettre en évidence des marqueurs de l'apoptose, ont été réalisés dans des conditions de normoxie et d'hypoxie. Grâce à des résultats obtenus par RNA-sequencing sur les cellules cancéreuses tête et cou, l'investigation de mécanismes potentiels par lesquels TMEM45A pourrait agir également été réalisée.

Pour la deuxième partie du mémoire, une autre technique d'invalidation a été mise en place. L'invalidation par la technique de CRISPR-Cas9 permet d'invalider un gène cible en y induisant des mutations par l'intermédiaire de l'endonucléase Cas9 et d'un ARN guide. L'analyse de l'invalidation de *TMEM45A* dans les clones générés par le système CRISPR-Cas9 a finalement été effectuée par des analyses de fragments.

L'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence un rôle potentiel de TMEM45A dans la chimiosensibilité des cellules issues du RCC.



## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES



**Tableau II.1 : Culture cellulaire - Matériel et réactifs**

Milieu de culture	<ul style="list-style-type: none"><li>- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contenant 1,5 g/L de glucose (Gibco, USA)</li><li>- L-glutamine 2 mM (Sigma-Aldrich, USA)</li><li>- Sérum de veau fœtal 10 % (Gibco, USA)</li><li>- Généticine 0,5 mg/mL (Thermo Fisher Scientific, USA)</li></ul>
PBS stérile (Phosphate Buffer Saline)	Pour 1 L : <ul style="list-style-type: none"><li>- 20 mL de tampon phosphate <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,5 mM à pH 7,4 (Merck, Germany)</li><li>- 9 g de NaCl 150 mM (Merck, Germany)</li></ul>
Trypsine-EDTA	Solution de trypsine 0,5 g/L avec EDTA 0,2 g/L (Gibco, USA)
Boîtes de culture de 75 cm <sup>2</sup> (T75) (Corning, USA)	
Tubes de 15 mL (Sterilin, UK)	
Centrifugeuse (Eppendorf, Germany)	

**Tableau II.2 : Incubation en hypoxie – Matériel et réactifs**

Milieu d'incubation	<ul style="list-style-type: none"><li>- Milieu CO<sub>2</sub>-indépendant</li><li>- L-glutamine 0,5 mM (Sigma-Aldrich, USA)</li></ul>
Solution de cisplatine	<ul style="list-style-type: none"><li>- 3,4 mg de cisplatine (Sigma-Aldrich, USA)</li><li>- 6 mL de NaCl 0,9 %</li></ul>



## 1 Culture cellulaire

### 1.1 Modèle cellulaire utilisé

Le modèle utilisé lors de ce mémoire est la lignée de cellules RCC4 plus pVHL. Ces cellules épithéliales sont dérivées d'une tumeur primaire de carcinome rénal et sont stablement transfectées avec le plasmide pcDNA3-VHL. Ce plasmide confère une résistance à la néomycine et permet de restaurer l'expression wild-type du gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (*VHL*) dans la lignée cellulaire RCC4 qui initialement, est déficiente pour *VHL* (voir le point « 1. Modèle d'étude » dans la partie III).

### 1.2 Repiquage des cellules

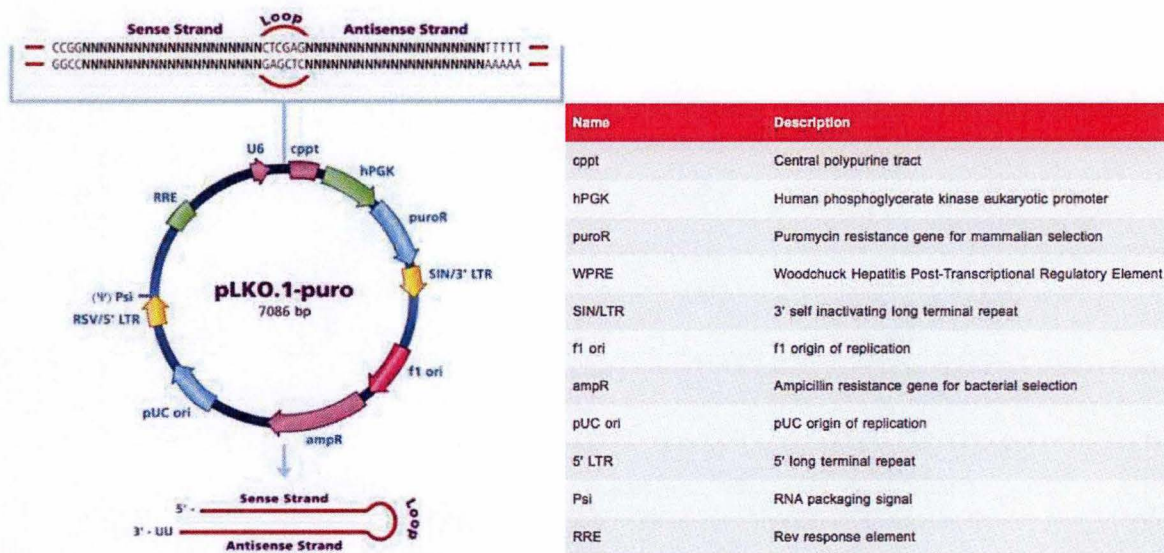
Les cellules RCC4 plus pVHL sont cultivées dans des boîtes de culture en polystyrène de 75 cm<sup>2</sup> (T75) contenant 15 mL de milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté avec la L-glutamine à 2 mM avec 10 % de sérum bovin fœtal et 0,5 mg/ml de généticine. Les cellules sont conservées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les cellules RCC4 plus pVHL sont repiquées tous les 3 à 4 jours selon le protocole suivant : le milieu de culture est décanté de la boîte et les cellules sont rincées une fois avec 10 mL de PBS pour retirer toute trace de sérum. Après avoir décanté le PBS, les cellules sont détachées à l'aide de 2 mL de trypsine-EDTA. La trypsine est une endoprotéase catalysant des clivages protéolytiques permettant de rompre d'une part les liaisons intercellulaires (cadhérines) et d'autre part, les liaisons existant entre les cellules et le support de culture (intégrines). L'EDTA, un chélateur du calcium, a pour effet de favoriser l'action de la trypsine en dissociant les intégrines des protéines de la matrice extracellulaire. Afin d'optimiser l'activité de la trypsine, la boîte de culture est incubée quelques minutes à 37°C dans une étuve sèche. Une fois détachées, les cellules sont récupérées avec 8 mL de milieu complet afin d'inhiber la trypsine via les inhibiteurs de protéases contenus dans le sérum, puis placées dans un tube de 15 mL. Le tube est mis à centrifuger pendant 5 minutes à 1000 rpm pour culoter les cellules. Après la centrifugation, le surnageant est décanté et le culot cellulaire est resuspendu avec 6 mL de milieu qui sont ensuite répartis dans une ou plusieurs boîtes T75. Du milieu frais est finalement ajouté pour obtenir un volume final de 15 mL et la ou les boîte(s) sont replacées dans l'incubateur (Tableau II.1).

## 2 Incubation en hypoxie

Pour les expériences d'hypoxie, le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant (4 mL en T25 et 500 µL en plaque 24 puits pour que l'hypoxie s'effectue efficacement) sans sérum supplémenté avec de la L-glutamine à 0,5 mM. Les cellules sont ensuite incubées 48h à 37°C soit en normoxie (N) dans une atmosphère normale avec 20 % d'O<sub>2</sub>, soit en hypoxie (H) dans une atmosphère contenant 1 % d'O<sub>2</sub> et 99 % d'N<sub>2</sub>. De plus, les cellules sont incubées avec ou sans cisplatine à une concentration de 5, 10, 20, 50 ou 100 µM (Tableau II.2).



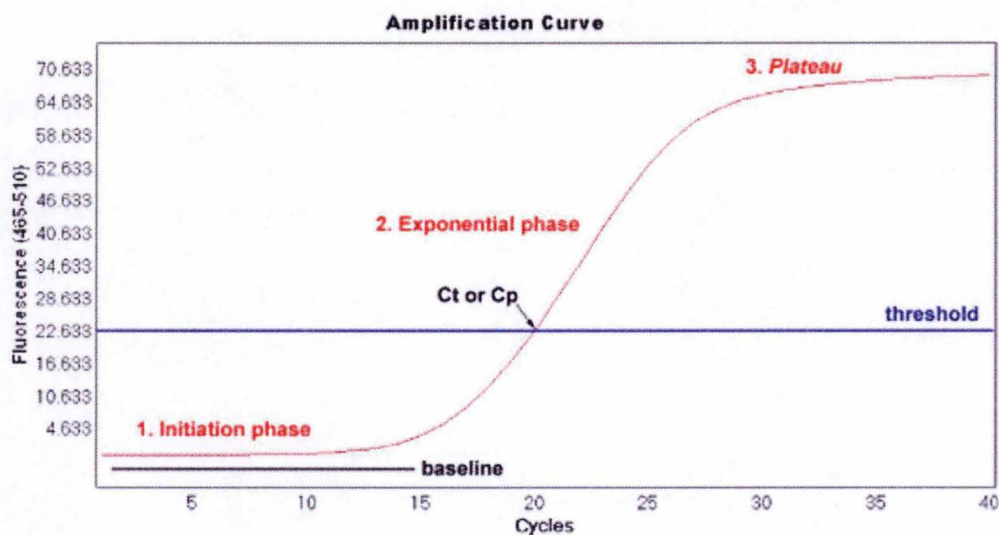


**Figure II.1 : Transduction lentivirale.**  
 Vecteur MISSION pLKO.1-puro utilisé pour la transduction lentivirale des cellules RCC4 plus pVHL. Ce vecteur contient une cassette shARN (short hairpin RNA) dont l’expression est dépendante du promoteur U6 et un gène de résistance à la puromycine.  
 Sigma-Aldrich, “Vector Map” <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/library-information/vector-map.html>

**Tableau II.3 : Transduction lentivirale - Matériel**

Particules lentivirales MISSION pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich, USA)	
Boîtes de culture en polystyrène de 25 cm <sup>2</sup> (T25) (Corning, USA)	
Milieu de transduction	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu de culture</li> <li>- Protamine sulfate 0,06 mg/mL (Sigma-Aldrich, USA)</li> </ul>
Milieu de sélection	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu de culture</li> <li>- Puromycine 4 µg/mL (Sigma-Aldrich, USA)</li> </ul>





**Figure II.2 : Courbe d'amplification d'une réaction de PCR en temps réel.**

La courbe d'amplification d'ADNc débute par une phase exponentielle suivie d'une phase plateau. C'est dans la partie linéaire de la phase exponentielle que la valeur Ct (Cycle threshold) correspondant au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence émise par le SYBR Green lié à l'ADN double brin amplifié dépasse une valeur seuil établie.

Caister Academic Press, "Real-Time Quantification Analysis " <https://www.highveld.com/pcr/real-time-pcr-quantification-analysis.html>

**Tableau II.4 : Extraction d'ARN total - Matériel et réactifs**

Boîtes de culture de 25 cm <sup>2</sup> (T25) (Corning, USA)
RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germany)
Racloirs (SPL Life Sciences, Korea)
Ethanol 70 % (Fisher Scientific, USA)
Eppendorfs de 1,5 mL et de 2 mL (QIAGEN, Germany)
Nanodrop Spectrophotometer ND-100 (Isogen Life Science, The Netherlands)

**Tableau II.5 : Rétro-transcription - Matériel et réactifs**

Reverse Transcription kit Promega Goscript (Promega, USA)
Blocs chauffants (Technique Dri-Block DB, UK)



### 3 Transduction lentivirale

#### 3.1 Principe

La transduction lentivirale permet l'introduction d'un plasmide dans le génome de la cellule hôte et l'expression stable de shARN (short hairpin RNA). Ces shARN interfèrent avec les ARNm du gène cible induisant ainsi la dégradation de ces derniers et l'invalidation de l'expression du gène cible. Dans cette étude, les cellules RCC4 plus pVHL ont été transduites avec des particules lentivirales MISSION pLKO.1-puro contenant une cassette shARN sous le promoteur U6 et un gène de résistance à la puromycine (Figure II.1). L'infection des cellules par ces particules lentivirales est conçue pour exprimer d'une part des shARN ne ciblant aucun ARNm de mammifère (shARN CTL) servant de contrôle ou d'autre part, des shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22).

#### 3.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture en polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> (T25) à une densité de 800 000 cellules par T25. Les cellules sont alors transduites avec des particules lentivirales shARN. La transduction est réalisée avec une multiplicité d'infection (MOI) de 5 dans du milieu frais contenant de la protamine sulfate (0,06 mg/mL) comme agent de transduction. 24 heures après la transduction, le milieu est remplacé par du milieu frais supplémenté avec de la puromycine (4 µg/mL) pour sélectionner les cellules infectées par les particules lentivirales et ayant incorporé le vecteur dans leur génome. La sélection dure 6 jours et après cela, les cellules restantes sont repiquées dans des boîtes T75 avec du milieu de culture frais sans puromycine (Tableau II.3).

### 4 Extraction d'ARN total et RT-qPCR

#### 4.1 Principe

La RT-qPCR (Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction) permet de quantifier l'abondance d'ARNm de gènes d'intérêt en temps réel. Après extraction et rétro-transcription de l'ARN total des cellules, l'ADNc obtenu est amplifié grâce à une polymérase, des amorces et des nucléotides. L'augmentation de la quantité d'ADNc est suivie tout au long de la réaction qui débute par une phase exponentielle due à l'excès de réactifs et atteint ensuite une phase de plateau qui s'explique entre autre par la compétition existant entre la renaturation et la liaison des amorces aux brins simples d'ADN. La quantité d'ADNc est mesurable grâce au SYBR Green, une molécule fluorescente s'intercalant entre les doubles brins d'ADN. Une valeur seuil est établie dans la partie linéaire de la phase exponentielle et lorsque la fluorescence émise par le SYBR Green dépasse cette valeur seuil, une valeur Ct (Cycle threshold) est obtenue. La valeur Ct correspond donc au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour atteindre cette valeur seuil et est inversement proportionnelle à l'abondance d'ADNc de départ (Figure II.2).

La valeur Ct du gène d'intérêt est normalisée avec celle d'un gène de référence dont l'expression reste invariable selon les conditions. Le gène de référence utilisé dans ce mémoire est 23 kDa, une protéine ribosomique.



**Tableau II.6 : PCR en temps réel – Matériel et réactifs**

Plaque 96 puits (Applied Biosystems, USA)		
SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)		
Gotaq qPCR Master Mix (Promega, USA)		
Centrifugeuse Centra CL3R (Thermo IEC, USA)		
Machine Step One Plus (Applied Biosystems, USA)		
Amorces forward (F) et reverse (R) (Integrated DNA Technologies, USA)		
23 kDa	F	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG
	R	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG
TMEM45A	F	TTATGCAGTAACCATTGTCATCGTT
	R	TGATTCTTGTTCCTCGTTCAGCATT
PolDIP2	F	TGCTGATTGATGCTCGTGAC
	R	AGGTGTAGGGGAGGATGTCT
UQCR10	F	GTTGGCAAGAAACGGCTTTA
	R	TTTGCAGAGGGCTTTGAAGT



## 4.2 Méthode

### 4.2.1 Extraction d'ARN total

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes T25 à une densité de 400 000 cellules par boîte. 24 heures plus tard, le milieu est retiré et remplacé par un milieu CO<sub>2</sub>-indépendant. Les cellules sont ensuite incubées en N ou H pendant 48 heures, avec ou sans cisplatine à 20 µM. Le milieu est décanté et 600 µL de tampon de lyse RLT sont ajoutés pour lyser les cellules qui sont ensuite raclées. Le lysat est ensuite récolté dans des microtubes RNase-free de 2 mL. L'ARN total est ensuite extrait en utilisant le kit RNeasy Mini et le QIAcube, en conditions « large samples with DNase » avec un volume d'élution de 40 µL. Après l'extraction par le QIAcube, les échantillons d'ARN sont récupérés dans des tubes de 1,5 mL et conservés à -70°C. Le dosage de la concentration en ARN s'effectue à l'aide du Nanodrop spectrophotomètre en mesurant l'absorbance à 260 nm (Tableau II.4).

### 4.2.2 Rétro-transcription de l'ARNm en ADNc

La rétro-transcription de l'ARNm en ADNc s'effectue à l'aide du kit Promega Goscript. 2 µg d'ARN totaux sont dilués à de l'eau RNase-free pour atteindre un volume de 12 µL. Les échantillons sont alors incubés à 70°C pendant 5 minutes. Un mix réactionnel de 8 µL contenant 4 µL de Buffer avec oligo dT, 2 µL d'enzyme Mix et 2 µL d'eau RNase free est ajouté à chaque échantillon pour obtenir un volume final de 20 µL. Les échantillons subissent ensuite un cycle thermique de 5 minutes à 25°C, puis 60 minutes à 42°C et enfin, 15 minutes à 70°C. Les tubes échantillons d'ADN sont par la suite directement placés sur glace, spinnés puis conservés à -20 °C (Tableau II.5).

### 4.2.3 PCR en temps réel

Les échantillons d'ADNc sont dilués 100x dans de l'eau MilliQ. La réaction d'amplification est effectuée dans des plaques 96 puits contenant 4 µL d'ADNc dilués et 16 µL de mix réactionnel par puits. Ce mix réactionnel est composé de 2 µL d'eau MilliQ ou 1,8 µL d'eau MilliQ avec 0,2 µL de CXR (carboxy-X-rhodamine), 2 µL d'amorces forward et d'amorces reverse à 3 µM et 10 µL de SYBR Green. Une fois les puits remplis, la plaque est scellée et centrifugée 1 minute à 600 rpm.

L'ADNc est quantifié en utilisant la méthode du cycle de seuil par l'instrument StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific). Les conditions de cyclage thermique sont composées d'une étape initiale de dénaturation à 90 ° C pendant 2 minutes suivie de 40 cycles à 95 ° C pendant 30 secondes et à 60 ° C pendant 1 minute (Tableau II.6).

Le traitement des données est réalisé via la méthode des  $\Delta\Delta Ct$ . Pour chaque échantillon, le Ct du gène de référence est soustrait du Ct du gène d'intérêt afin de normaliser la quantité d'ADNc chargée dans chaque puits :

$\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ du gène dans une condition} - \Delta Ct \text{ du gène dans la condition contrôle}$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$  = niveau d'induction ou de répression du gène par rapport à la condition contrôle



**Tableau II.7 : Comptage cellulaire – Matériel et réactifs**

Milieu de comptage	<ul style="list-style-type: none"> <li>- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) contenant 1,5 g/L de glucose (Gibco, USA)</li> <li>- L-glutamine 2 mM (Sigma-Aldrich, USA)</li> <li>- Sérum de veau fœtal 10% (Gibco, USA)</li> </ul>
PBS non stérile	Pour 1 L : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 mL de tampon phosphate <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,5 mM à pH 7,4 (Merck, Germany)</li> <li>- 9 g de NaCl 150 mM (Merck, Germany)</li> </ul>
Trypsine-EDTA	Solution de trypsine 0,5 g/L avec EDTA 0,2 g/L (Gibco, USA)
Boîtes de culture de 25 cm <sup>2</sup> (T25) (Corning, USA)	
Centrifugeuse (Eppendorf, Germany)	

**Tableau II.8 : Marquage au BrdU – Matériel et réactifs**

BrdU Flow Kit (BD Pharmingen, USA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Flurochrome-conjugated anti-BrdU Antibody</li> <li>- BD Cytofix/Cytoperm Buffer</li> <li>- BD Perm/Wash Buffer (10X)</li> <li>- BD Cytoperm Permeabilization Buffer plus</li> <li>- 7-AAD</li> <li>- BrdU (10 mg/mL)</li> <li>- DNase (1 mg/mL)</li> </ul>
PBS non stérile	Pour 1 L : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 mL de tampon phosphate <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,5 mM à pH 7,4 (Merck, Germany)</li> <li>- 9 g de NaCl 150 mM (Merck, Germany)</li> </ul>
Staining Buffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- PBS</li> <li>- 3 % HIF (heat-inactivated FBS) (Thermo Fisher Scientific, USA)</li> </ul>



## 5 Comptage cellulaire

### 5.1 Méthode

Les cellules sontensemencées dans quatre boîtes T25 (pour le temps 0, 24, 48 et 72 heures) par lignée cellulaire à une densité de 250 000 cellules par boîte. Tous les jours, une boîte T25 par lignée est analysée: le milieu est prélevé et les cellules sont rincées avec du PBS avant d'être trypsinisées. Les cellules sont récupérées avec 5 mL de milieu, mises dans un tube de 15 mL et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant est ensuite retiré et le culot est resuspendu dans 1 mL de milieu. 10 µL d'échantillon sont prélevés et placés dans la chambre Neubauer. Le nombre de cellules dans chaque suspension cellulaire est compté 4 fois pour en calculer la moyenne (Tableau II.7).

## 6 Marquage au BrdU et cytométrie en flux (FACS)

### 6.1 Principe

Le marquage BrdU (bromodésoxyuridine) est une technique permettant de déterminer la position des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire, mais aussi d'évaluer de manière quantitative le nombre de cellules synthétisant de l'ADN durant la prolifération cellulaire. Le BrdU est un nucléoside synthétique qui peut être incorporé dans l'ADN à la place de la thymidine au cours de la réplication des cellules, révélant ainsi les cellules en phase S du cycle cellulaire. Afin de détecter et de quantifier la quantité de BrdU incorporé dans l'ADN des cellules, des anticorps fluorescents anti-BrdU sont ajoutés et détectés à l'aide de la cytométrie en flux. De plus, un marquage de l'ADN total est réalisé avec le 7-AAD (7-aminoactinomycine D), une molécule fluorescente s'intercalant entre l'ADN double brin. Une analyse de cytométrie en flux des deux marquages permet ensuite l'énumération et la caractérisation des cellules qui synthétisent activement l'ADN, par incorporation de BrdU, et donne également la position des cellules dans le cycle cellulaire qui est défini par les intensités de coloration de 7-AAD.

La cytométrie en flux est une technique permettant de caractériser individuellement et quantitativement de cellules en suspension dans un liquide. Elle permet de compter et de caractériser des cellules en les faisant défiler à grande vitesse dans un faisceau laser. La lumière réémise permet la quantification de la fluorescence associée à chaque cellule.

### 6.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des boîtes T25 à une densité de 300 000 cellules par boîte. 48 heures plus tard, le milieu est remplacé par du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant contenant le BrdU dilué à une concentration finale de 10 µM. Après 45 min, les cellules sont rincées, trypsinisées et centrifugées 5 min à 1500 rpm. Afin de fixer et de perméabiliser les cellules, celles-ci sont resuspendues dans du BD Cytofix/Cytoperm et incubées pendant 20 min à 4°C. Ensuite, les cellules sont rincées avec du BD Perm/Wash Buffer 1X et sont centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm. Les cellules sont resuspendues dans 500 µL de Staining Buffer. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du BD Cytoperm Permeabilization Buffer Plus et incubées 10 min à 4°C, avant d'être rincées avec du BD Perm/Wash Buffer et centrifugées durant 5 min à 1500 rpm. Les cellules sont refixées avec du BD Cytofix/Cytoperm et sont incubées pendant 5 min à température ambiante. Ensuite, les cellules sont rincées avec du BD



**Tableau II.9 : Marquage en immunofluorescence - Matériel et réactifs**

Plaques en polystyrène 24 puits (Costar, USA)	
Lamelles couvre-objets de 13 mm de diamètre (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Germany)	
PBS non stérile	Pour 1 L : - 20 mL de tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,5 mM à pH 7,4 (Merck, Germany) - 9 g de NaCl 150 mM (Merck, Germany)
PBS-PFA 4%	- PFA 0,04 g/mL (Merck, Germany) - PBS non stérile
PBS-Triton X-100 1 %	- Triton X-100 0,01 g/mL (Merck, Germany) - PBS non stérile
PBS-BSA 2 %	- BSA 0,02 g/mL (Santa Cruz Biotechnology, USA) - PBS non stérile
Hoechst #H-21491 (Thermo Fisher Scientific, USA)	
Lames porte-objet (VWR, Leuven)	
Mowiol (Sigma-Aldrich, USA)	
Microscope confocal à fluorescence TCS SP5 (Leica, Germany)	

**Tableau II.10 : Marquage en immunofluorescence - Anticorps utilisés**

Protéine	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
TMEM45A	Anti-TMEM45A lapin Dilution : 1/400 # HPA024082-100UL (Sigma-Aldrich, USA)	Alexa 488 nm chèvre anti-lapin Dilution : 1/1000 #A-11008 (Thermo Fisher Scientific, USA)
Golgin-97	Anti-Golgin-97 souris Dilution : 1/400 #A-21270 (Thermo Fisher Scientific, USA)	Alexa 568 nm chèvre anti-souris Dilution : 1/1000 #A-11004 (Thermo Fisher Scientific, USA)



Perm/Wash Buffer 1X et sont centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm. Un traitement avec de la DNase est ensuite réalisé afin d'exposer le BrdU. Pour cela, les cellules sont resuspendues dans de la DNase diluée à 300 µg/mL dans du PBS et sont incubées durant 1 heure à 37°C. Les cellules sont rincées avec du BD Perm/Wash Buffer et sont centrifugées pendant 5 min à 1500 rpm. Par la suite, le BrdU est marqué avec des anticorps conjugués au fluorochrome FITC (isothiocyanate de fluorescéine). Les cellules sont ensuite resuspendues dans du BD Perm/Wash Buffer contenant les anticorps anti-BrdU dilués 50X et sont incubées durant 20 minutes à température ambiante. Les cellules sont rincées avec du BD Perm/Wash Buffer 1X et sont centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm. Finalement, les cellules sont resuspendues dans du Staining Buffer et 20 µL de 7-AAD sont ajoutés par échantillon afin de marquer l'ADN total. Les cellules sont conservées à 4°C et dans l'obscurité avant d'être analysées en cytométrie de flux (Tableau II.8).

## 7 Marquage en immunofluorescence

### 7.1 Principe

Le marquage en immunofluorescence est une technique permettant de visualiser une protéine d'intérêt, de la localiser et d'en évaluer l'abondance relative. Ce marquage se fait via un anticorps primaire spécifique reconnaissant la protéine. Un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome reconnaît à son tour la chaîne lourde de l'anticorps primaire. Le fluorochrome est une substance chimique capable d'émettre de la lumière après excitation. Différents fluorochromes sont excités avec une longueur d'onde spécifique et émettent des photons ayant une longueur d'onde qui leur est également spécifique. Cette méthode de marquage indirect permet une amplification du signal et une détection aisée de la protéine d'intérêt à l'aide d'un microscope confocal.

### 7.2 Méthode

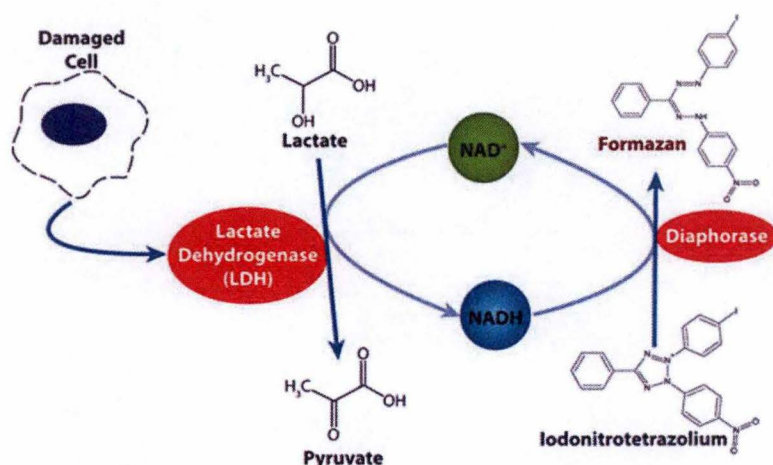
Les cellules sontensemencées sur des couvre-objets stérilisés dans des plaques à 24 puits à une densité de 25 000 cellules par puits. 24 heures plus tard, le milieu est retiré et remplacé par du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant. Les cellules sont ensuite incubées dans des conditions N ou H pendant 48 heures.

Après le temps d'incubation, le milieu est décanté et les cellules sont fixées pendant 10 minutes dans du PBS-PFA 4 % (paraformaldéhyde) avant d'être rincées 3 fois au PBS et perméabilisées avec du PBS-Triton X-100 1 % pendant 5 minutes à température ambiante. Après perméabilisation, les cellules sont rincées 3 fois pendant 10 minutes avec du PBS-BSA 2 % (albumine de sérum bovin). Par la suite, les cellules sur les couvre-objets sont incubées avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C à l'obscurité dans une chambre humide en verre. Le lendemain, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS-BSA 2 % avant d'être incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire et simultanément avec le Hoechst dilué à 2 µg/mL dans du PBS-BSA 2 % à température ambiante dans l'obscurité. Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS-BSA 2 % et une fois avec du PBS. Les lamelles sont finalement montées sur lames porte-objets à l'aide d'une goutte de Mowiol chauffée à 57°C puis conservées à 4°C pour être observées plus tard au microscope confocal à fluorescence (Tableau II.9 et Tableau II.10).









**Figure II.4 : Test LDH.**

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme libérée par les cellules dont la membrane plasmique est endommagée. Elle catalyse la conversion du lactate en pyruvate en présence de NAD<sup>+</sup>. La formation de NADH produite lors de cette réaction permet à la diaphorase de catalyser la réduction des sels de tétrazolum en formazan. La densité optique du dérivé formazan résultant peut être mesurée pour évaluer l'activité enzymatique de la LDH et ainsi en déduire la cytotoxicité.

G-Biosciences, "Cytoscan™ LDH Cytotoxicity Assay" <https://www.gbiosciences.com/Bioassays/CytoScan-LDH-Cytotoxicity-Assay>

**Tableau II.12 : Test LDH - Matériel et réactifs**

Plaques en polystyrène 24 puits (Costar, USA)	
PBS-Triton X-100 4 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Triton X-100 0,04 g/mL (Merck Millipore, Germany)</li> <li>- PBS non stérile</li> </ul>
Kit de détection de cytotoxicité ROCHE (Roche Applied Science, Switzerland)	
Spectrophotomètre (Bio-Rad, USA)	



## 8 Test MTT

### 8.1 Principe

Le test MTT permet d'évaluer le nombre relatif de cellules vivantes par leur capacité d'être métaboliquement actives et aussi de cliver le MTT (Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium) en son dérivé formazan qui forme des cristaux insolubles en milieu aqueux, de coloration mauve. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. L'absorbance du produit de cette réaction peut être mesurée et une corrélation avec la viabilité cellulaire peut ainsi être établie. En présence d'une molécule toxique telle que le cisplatine, le nombre de cellules capables de réaliser cette réaction diminue (Figure II.3).

### 8.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des plaques à 24 puits à une densité de 25 000 cellules par puits. 24 heures plus tard, le milieu est décanté et remplacé par du milieu CO<sub>2</sub>-indépendant seul (pour les tests de prolifération cellulaire) pendant 24 heures et 48 heures, ou avec cisplatine (pour les tests de cytotoxicité) à différentes concentrations pendant 48 heures.

Au temps voulu, 500 µL de solution MTT, composée de MTT dilué à 2,5 mg/mL dans du PBS, sont ajoutés à chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 2 heures à 37°C afin que les cellules incorporent le MTT et catalysent sa transformation en dérivé formazan. Après le temps d'incubation, les puits sont décantés pour y placer 1 mL de tampon de lyse et solubiliser les cristaux de formazan. La plaque est replacée pendant 1 heure en chambre chaude à 37°C. Enfin, la densité optique est lue au spectrophotomètre à 570 nm (Tableau II.11).

## 9 Test LDH

### 9.1 Principe

Le test LDH (lactate déshydrogénase) permet d'évaluer la cytotoxicité induite par une molécule. La LDH est une enzyme relarguée par les cellules endommagées. Elle catalyse la conversion du lactate en pyruvate lors de présence de NAD<sup>+</sup>. La formation de NADH produite lors de cette réaction permet à la diaphorase de catalyser la réduction des sels detétrazolium en formazan. La densité optique du dérivé formazan résultant peut être mesurée et une corrélation avec la cytotoxicité peut ainsi être établie (Figure II.4).

### 9.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des plaques à 24 puits à une densité de 25 000 cellules par puits. 24 heures plus tard, le milieu est retiré et remplacé par un milieu indépendant du CO<sub>2</sub>. Les cellules sont ensuite incubées dans des conditions N ou H pendant 48 heures avec ou sans cisplatine à 20 µM.

Le milieu de chaque puits est récolté et transféré dans des eppendorfs de 1,5 ml appelés "Culot" (C) puis placés sur glace. 250 µL de PBS-Triton X-100 4 % sont ajoutés sur les cellules adhérentes dans chaque puits et les plaques sont laissées à température ambiante avec une légère agitation. 10 minutes après, le lysat cellulaire dans les puits des plaques est recueilli dans une autre série d'eppendorfs nommés "Lysat" (L). Les eppendorfs "Culot" (C) sont centrifugés pendant 5 minutes à 2000 rpm/min à 4°C. Après centrifugation, le surnageant



**Tableau II.13 : Extraction protéique - Matériel et réactifs**

Boîtes de culture de 25 cm <sup>2</sup> (Costar, USA)	
PBS non stérile	Pour 1 L : - 20 mL de tampon phosphate KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 mM à pH 7,4 (Merck, Germany) - 9 g de NaCl 150 mM (Merck, Germany)
Racloirs (SPL Life Sciences, Korea)	
Centrifugeuse à godets pivotants (Eppendorf, Germany)	
Centrifugeuse (Eppendorf, Germany)	
PIC (Phosphatase Inhibitor Cocktail)	Dissoudre une tablette de Complete protease inhibitor cocktail 25X (Roche, Germany) dans 2 mL d'eau
PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer)	- Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 25 mM (Sigma-Aldrich, USA) - PNPP (Para-NitroPhényl Phosphate) 250 mM (Sigma-Aldrich, USA) - β-glycérophosphate 250 mM (Sigma-Aldrich, USA) - NaF 125 nM (Merck, Germany)
Tampon de lyse stock 2x	- 929 mg de Tris (Trizma Base) 80 mM (ICN Biomedicals, USA) - 2,23 g de KCl 300 mM (Merck, Germany) - 74,44 mg d'EDTA (Tritriplex III) 2 mM (Merck, Germany)
Tampon de lyse	Pour 1 mL : - 500 µL de tampon de lyse 2X - 290 µL H <sub>2</sub> O - 10 µL Triton X100 - 85 µL de PIC - 85 µL de PIB

**Tableau II.14 : Dosage de la concentration en protéines - Matériel et réactifs**

Plaques en polystyrène 96 puits (Costar, USA)
BSA à 2 µg/µL (Bovin Serum Albumin) (Sigma-Aldrich, USA)
Pierce 660 nm (Thermo Fisher Scientific, USA)
Spectrophotomètre (Bio-Rad, USA)



des eppendorfs "Culot" est transféré dans une troisième série d'eppendorfs appelés "Surnageant" (S) tandis que les culots sont resuspendus dans 250 µL de PBS-Triton X-100 4 %.

100 µL de chaque échantillon sont placés dans une plaque à 96 puits, à l'exception des échantillons de "Lysat" dont 5 µL sont dilués dans 95 µL de PBS-Triton X-100 4 %. 100 µL de Kit de détection de cytotoxicité sont ajoutés dans chaque puits. Après 15 minutes de réaction, la densité optique est lue avec un spectrophotomètre à 490 nm et 655 nm toutes les 15 minutes jusqu'à ce qu'au moins une valeur atteigne 2 (Tableau II.12).

Le pourcentage de cytotoxicité est alors calculé comme suit:

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{100 * (C - blc) + ((S - blc) * 4)}{(C - blc) + ((S - blc) * 4) + ((L - blc) * 20)}$$

## 10 Extraction protéique et Western Blot

### 10.1 Principe

La technique du Western Blot consiste à séparer les protéines d'un échantillon en fonction de leur poids moléculaire, de les identifier et d'en évaluer l'abondance à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines d'intérêt. Cette technique se fait en plusieurs étapes et nécessite au préalable une extraction protéique et une dénaturation à haute température des échantillons. Cette dénaturation se fait en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate) ou de LDS (lithium dodécyl sulfate), un détergent anionique permettant la dénaturation des protéines et leur conférant une charge globale négative. Après les avoir chargées sur un gel de polyacrylamide, les protéines sont séparées par migration via un courant électrique. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane en fluorure de polyvinylidène (PVDF) permettant la reconnaissance des protéines d'intérêt par des anticorps primaires. Des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome sont dirigés contre la chaîne lourde des anticorps primaires afin d'amplifier le signal.

### 10.2 Méthode

#### 10.2.1 Extraction protéique

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes T25 à une densité de 400 000 cellules par boîte. 24 heures plus tard, le milieu est retiré et remplacé par du CO<sub>2</sub>-indépendant. Les cellules sont ensuite incubées en N ou H pendant 48 heures avec ou sans cisplatine à 20 µM pendant 48 heures. Après le traitement, le milieu est collecté dans des tubes de 15 mL et mis à centrifuger pendant 5 minutes à 1 200 rpm à 4°C. Les cellules dans les T25 sont raclées dans 50 µL de tampon de lyse, collectées dans un eppendorf de 1,5 mL. 10 µL de cette suspension cellulaire sont utilisés pour resuspendre et récupérer le culot des tubes de 15 mL. Les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 13 000 rpm à 4°C pour finalement récupérer les surnageants qui peuvent par la suite être stockés à -70°C (Tableau II.13).

#### 10.2.2 Dosage de la concentration en protéines

Pour chaque échantillon, la concentration en protéines a été évaluée à l'aide du dosage de Pierce 660 nm. Cette méthode est réalisée à partir du colorant commercial Pierce composé de complexes sonde-métal qui absorbent la lumière à 660 nm. En milieu acide, les sondes sont



**Tableau II.15 : Préparation des gels et électrophorèse - Matériel et réactifs**

Tampon de concentration	Pour 100 mL : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 6,06 g de Tris (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>- 0,4 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>- pH 6,8</li> </ul>
Tampon de séparation	Pour 200 mL: <ul style="list-style-type: none"> <li>- 36,3 g de Tris (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>- 0,8 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>- pH 8,9</li> </ul>
Running gel 12 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2,9 mL de tampon de séparation</li> <li>- 4,8 mL d'acrylamide 30% (Bio-Rad, USA)</li> <li>- 4,3 mL d'eau</li> <li>- 60 µL d'APS 25 % (Bio-Rad, USA)</li> <li>- 3,6 µL de TEMED (Bio-Rad, USA)</li> </ul>
Stacking gel 4 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,25 mL de tampon de concentration</li> <li>- 0,5 mL d'acrylamide 30% (Bio-Rad, USA)</li> <li>- 3,25 mL d'eau</li> <li>- 20 µL d'APS 25% (Bio-Rad, USA)</li> <li>- 5 µL de TEMED (Bio-Rad, USA)</li> </ul>
Gel « home-made » 3,5-12 %	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 mL de running gel 12%</li> <li>- 3 mL de stacking gel</li> </ul>
Gel Bis-Tris Nu-PAGE 4-12 % (Invitrogen, USA)	
Tampon de migration 10X	Pour 1 L : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 30,25 g de Tris (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>- 144 g de glycine (Merck, Germany)</li> <li>- 10 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>- pH 8,7</li> </ul>
Tampon de migration Nu-PAGE	Pour 1 L : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 mL de tampon MES (Invitrogen, USA)</li> <li>- 950 mL d'eau</li> </ul> + 500 µL d'antioxydant (Invitrogen, USA) pour 200 mL
Bleu de charge 5X	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10 ml de tampon de concentration</li> <li>- 10 ml de SDS 20 % (ICN Biomedicals, USA)</li> <li>- 5 ml de β-mercaptoéthanol (Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich, USA)</li> <li>- 10 ml de glycérol (Merck, Germany)</li> <li>- 17,5 mg de Bleu de bromophénol (Merck, Germany)</li> <li>- pH 6,8</li> </ul>
Tampon bleu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 95 µL de LDS sample buffer 4x (Thermo Fisher Scientific, USA)</li> <li>- 5 µL de DTT 1M</li> </ul>
Etalon de poids moléculaire See Blue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen, USA)	



**Tableau II.16 : Transfert sur membrane – Matériel et réactifs**

Tampon de transfert Trans-blot® Turbo™	Pour 1 L : <ul style="list-style-type: none"><li>- 20 ml de tampon de transfert 5X (Bio-Rad, USA)</li><li>- 20 ml d'éthanol (Merck, Germany)</li><li>- 60 ml d'eau miliQ</li></ul>
Méthanol 100 % (VWR, USA)	
Stacks de transfert (Bio-Rad, USA)	
Membrane en PVDF (Bio-Rad, USA)	
Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA)	

**Tableau II.17 : Traitement des membranes et révélation - Matériel**

Solution de blocage	<ul style="list-style-type: none"><li>- Solution Li-Cor Blocking Buffer 50% (Li-Cor Biosciences, USA)</li><li>- PBS non sterile 50 %</li></ul>
Solution de rinçage	<ul style="list-style-type: none"><li>- Tween 20 0,1 % (Merck, Germany)</li><li>- PBS non stérile</li></ul>
Scanner Odyssey Image System (Li-Cor Biosciences, USA)	

**Tableau II.18 : Western Blot - Anticorps utilisés**

Protéine	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Caspase 3	Anti-Caspase 3 lapin Dilution : 1/2 000 # 9662S (Cell Signaling Technology, USA)	IRDye 800 CW anti-lapin Dilution : 1/10 000 #926-32211 (Li-Cor Biosciences, USA)
PARP	Anti-PARP souris Dilution : 1/1 000 #51-6639GR (BD Biosciences, USA)	IRDye 680RD anti-souris Dilution : 1/10 000 #926-68070 (Li-Cor Biosciences, USA)
β-actine	Anti-β-actine souris Dilution : 1/10 000 #A5441 (Sigma-Aldrich, USA)	IRDye 680RD anti-souris Dilution : 1/10 000 #926-68070 (Li-Cor Biosciences, USA)



déprotonnées et interagissent avec les protéines chargées positivement. Cette méthode permet d'évaluer la concentration protéique d'un échantillon grâce à une analyse colorimétrique où l'absorbance des échantillons est mesurée par spectrophotométrie à 660 nm. Afin de pouvoir déterminer la concentration protéique en fonction de l'absorbance, une courbe d'étalonnage obtenue par l'absorbance de différentes concentrations de BSA diluée dans de l'eau est établie. 10 µL de chaque échantillon dilué (1 µL + 9 µL d'eau) sont déposés dans une plaque 96 puits. Un blanc avec le tampon de lyse est également effectué afin de pouvoir soustraire son absorbance de celle des échantillons. 150 µL de solution de Pierce sont ajoutés à chaque puits et la plaque est ensuite placée à l'obscurité pendant 5 minutes (temps nécessaire pour que la réaction du Pierce soit stabilisée). L'absorbance est mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour évaluer la concentration protéique des échantillons sur base de l'équation de la courbe d'étalonnage ( $y = ax + b$ ) avec  $y$  représentant l'absorbance et  $x$  la concentration protéique (Tableau II.14).

### 10.2.3 Préparation des gels de polyacrylamide

Pour des protéines d'intérêt de la voie UPR, la séparation se fait sur des gels « home-made ». Les gels sont coulés dans un montage composé d'un portoir avec une bande amovible, d'un support, d'une grande plaque avec un spacer ainsi qu'une petite plaque. Le gel de séparation 12 % (running gel) est coulé en premier et une fine couche d'isobutanol est ajoutée délicatement pour isoler le gel de l'oxygène et favoriser la polymérisation. Après 40 minutes de polymérisation à température ambiante, l'isobutanol est enlevé et le gel est rincé avec de l'eau milliQ. Le gel de concentration 4 % (stacking gel) est ensuite coulé. Un peigne comprenant 10 puits est inséré et le gel polymérise durant 30 min.

Pour la mise en évidence des protéines d'intérêt de l'apoptose (PARP, PARP clivée, Caspase 3 et Caspase 3 clivée), la séparation se fait sur des gels Bis-Tris NuPAGE 4-12 %.

### 10.2.4 Électrophorèse

Les lysats cellulaires sont mélangés avec de l'eau milliQ de sorte qu'il y ait 15 µg de protéines pour chaque échantillon et 6 µL de bleu de charge pour obtenir un volume final de 30 µL par puits. Le bleu correspond à du bleu de charge 5x pour les gels « home-made » ou du tampon d'échantillon bleu composé de 95 µL de LDS Sample Buffer 4x et 5 µL de DTT (Dithiothreitol) 1 M pour les gels NuPAGE. Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 10 minutes à 70°C puis centrifugés 2 minutes à 13 000 rpm. Les 30 µL d'échantillon ainsi que 3 µL d'étalon de poids moléculaire sont chargés dans les puits du gel placé dans une cuve de migration dans laquelle 1 L de tampon d'électrophorèse 1x est ajouté pour les gels « home-made ». Dans le cas des gels NuPAGE, le tampon d'électrophorèse est composé de tampon MES 5 % et 500 µL d'antioxydant sont rajoutés dans le tampon entre les deux gels. La migration s'effectue à 200 V, 400 mA et 15 W par gel, jusqu'à ce que le front de migration ait atteint le bas du gel (environ 40 minutes) (Tableau II.15).

### 10.2.5 Transfert sur membrane

Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel est démoulé pour transférer les protéines sur une membrane en PVDF qui doit d'abord être hydratée dans du méthanol durant 1 minute puis dans le tampon de transfert pendant au moins 3 minutes. Les deux stacks de transfert doivent aussi être immergés dans du tampon de transfert au moins pendant 3 minutes. Les différents éléments sont alors placés au centre de la cassette de transfert du Trans-Blot Turbo selon l'ordre précis du bas vers le haut : un stack de transfert, la membrane, le gel et un stack de



**Tableau II.19 : Production de particules lentivirales – Matériel et réactifs**

Boîtes de culture de 75 cm <sup>2</sup> (Costar, USA)	
Mix de transfection	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 µg de plasmid d'intérêt (shARN GFP, shARN TMEM45A-1 ou TMEM45A-4) (Sigma-Aldrich, USA)</li> <li>- 2 µg de pCMV-dR8.91 (Delta 8.9) (Addgene, USA)</li> <li>- 1 µg de VSV-G (Addgene, USA)</li> <li>- 60 µL de CaCl<sub>2</sub> 2M (Thermo Fisher Scientific, USA)</li> <li>- 410 µL d'eau miliQ</li> </ul>
Solution HeBS 2X	Pour 500 mL : <ul style="list-style-type: none"> <li>- 8 g de NaCl 280 mM (Merck, Germany)</li> <li>- 0,37 g de KCl 10 mM (Sigma-Aldrich, USA)</li> <li>- 0,1065 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM (Sigma-Aldrich, USA)</li> <li>- 1 g de Dextrose 12 mM (Sigma-Aldrich, USA)</li> <li>- 5 g de Hepes 50 mM (Sigma-Aldrich, USA)</li> </ul>



transfert. Le transfert est alors réalisé durant 7 minutes à 2.5 A et 25 V pour les gels « home-made » et durant 30 minutes à 1.0 A et 25 V par le Trans-Blot Turbo (Tableau II.16).

#### 10.2.6 Traitement des membranes et révélation

Une fois le transfert terminé, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation avec une solution de blocage composé de réactif Li-Cor dilué 2x dans du PBS afin de saturer tous les sites de liaisons aspécifiques des anticorps sur la membrane. La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué de manière appropriée dans la solution Li-Cor avec 0,1 % de Tween 20. Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois 5 minutes avec du PBS-Tween 20 0,1 % puis est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dilué dans une solution Li-Cor contenant 0,1% de Tween pendant 1 heure à température ambiante. Après l'incubation, la membrane est de nouveau lavée 3 fois 5 minutes avec du PBS-Tween 20 0,1 % puis et 2 fois dans du PBS seul. Finalement, la membrane est séchée dans l'obscurité en chambre chaude à 37°C pendant une heure avant d'être scannée avec l'« Image System Odyssey ». La fluorescence est quantifiée à l'aide du logiciel d'imagerie Odyssey V3.0 (Tableau II.17 et Tableau II.18).

## 11 Technique de CRISPR-Cas9

### 11.1 Principe

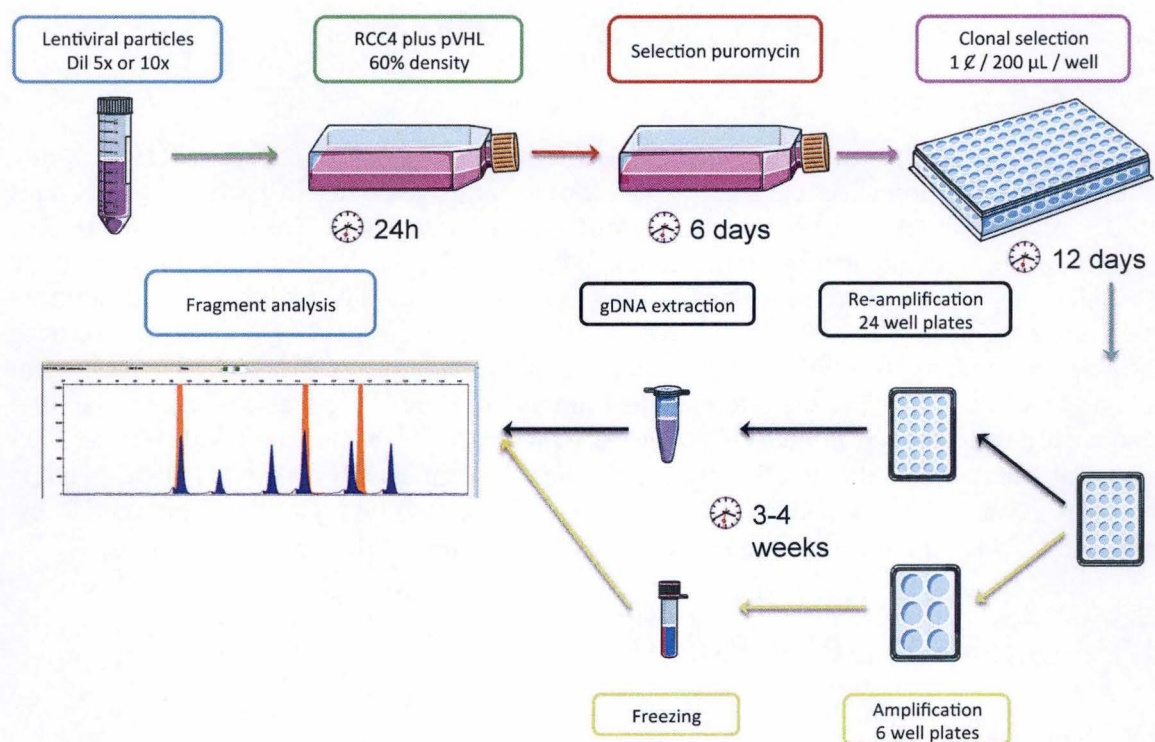
La technique du CRISPR-Cas9 (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated protein 9) est une méthode d'édition du génome permettant d'insérer, de remplacer ou de modifier un gène. Dans ce cas-ci, le but était de créer une lignée knock out (KO) pour *TMEM45A*. Elle est composée de deux éléments essentiels : l'endonucléase Cas9 ainsi qu'un ARN guide (ARNg), complémentaire à une séquence d'ADN cible. Dans le noyau de la cellule, l'ARNg reconnaît la séquence d'ADN cible, s'y hybride pour que la Cas9 clive l'ADN et y induise une cassure double brin. Cette cassure peut conduire à l'inactivation du gène par production d'indels (insertion/délétion) à travers deux types de réparation : la jonction d'extrémités non-homologues et la recombinaison homologue.

### 11.2 Méthode

#### 11.2.1 Production de particules lentivirales

Les vecteurs lentiviraux sont produits dans des cellules HEK 293T qui sont d'abord ensemencées dans des boîtes T75 de sorte que 24 heures après, les cellules soient à environ 60 % de confluence. Le lendemain, les cellules sont transfectées afin qu'elles expriment les gènes lentiviraux essentiels à la génération de particules lentivirales. Dans un eppendorf un mix contenant 410 µL d'eau, 3 µg de plasmide d'intérêt (shARN GFP, shARN *TMEM45A*-1 ou *TMEM45A*-4), 2 µg de pCMV-dR8.91 (Delta 8.9), 1 µg de VSV-G et 60 µL de CaCl<sub>2</sub> 2M est préparé puis vortexé. L'utilisation du plasmide pCMV-dR8.91 (Delta 8.9) contenant les gènes viraux *gag*, *pol* et *rev* et du plasmide VSV-G est nécessaire à l'expression du packaging et de l'enveloppe des particules lentivirales. 480 µL de solution HeBS sont ensuite ajoutés goutte à goutte au mix puis l'ensemble est directement vortexé durant au moins 10 secondes et laissé reposer 20 minutes à température ambiante. Le mix est ensuite ajouté goutte à goutte sur l'ensemble des cellules HEK 293T. Après 8 heures d'incubation, le milieu est remplacé par 15 mL de milieu frais (Tableau II.19).





**Figure II. 5 : Protocole suivi pour l'invalidation de TMEM45A par le système CRISPR-Cas9.**  
(S. Ayama, séminaire URBC)

**Tableau II.20 : Transduction lentivirale – Matériel et réactifs**

Filtre de 0,45 $\mu$ m (Merck, Germany)	
Boîtes de culture en polystyrène de 25 cm <sup>2</sup> (T25) (Corning, USA)	
Milieu de transduction	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu de culture</li> <li>- Polybrène 10 mg/mL (Sigma-Aldrich, USA)</li> </ul>
Milieu de sélection	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu de culture</li> <li>- Puromycine 4 <math>\mu</math>g/mL (Sigma-Aldrich, USA)</li> </ul>



### 11.2.2 Transduction des cellules RCC4 plus pVHL

48 heures après la transfection des cellules HEK 293T, le milieu contenant les particules lentivirales est collecté et filtré à travers un filtre de 0,45 µm. Du milieu de culture supplémenté avec du polybrène (10 mg/mL) est ensuite ajouté de sorte que le surnageant lentiviral soit dilué 5x. L'ajout de polybrène, un polymère cationique, permet d'augmenter l'efficacité de transduction en réduisant les répulsions existant entre la surface cellulaire et les particules lentivirales. Le milieu de culture des cellules RCC4 plus pVHL est remplacé par le milieu contenant les particules lentivirales. 8 heures après la transduction, le milieu lentiviral est remplacé par du milieu frais simple et 24 heures après par du milieu frais supplémenté avec de la puromycine (4 µg/mL) afin de sélectionner les cellules ayant bien intégré le vecteur. Cette sélection dure 6 jours (Tableau II.20) (Figure I.5).

### 11.2.3 Dilution limite et amplification clonale

Lorsque les cellules sélectionnées ont proliféré jusqu'à atteindre une confluence de 80-90 % dans la boîte T25 d'origine, les cellules subissent un passage classique : une partie est utilisée pour faire une dilution limite et l'autre partie est congelée et stockée dans l'azote liquide. La dilution limite consiste à diluer une suspension cellulaire dans le but d'isoler une seule et unique cellule par puits pour qu'elle prolifère et engendre par la suite une population clonale. Pour cela, les cellules ont été comptées sur lame de Neubauer au préalable pour connaître la densité cellulaire de la suspension initiale. Une première dilution intermédiaire est d'abord effectuée dans le but d'obtenir une densité cellulaire de 10 000 cellules par mL. Après homogénéisation, 20 µL de cette suspension cellulaire sont ensuite placés dans 40 mL de milieu afin d'obtenir une densité de 1 cellule par 200 µL. Cette nouvelle suspension cellulaire est homogénéisée et 200 µL sont placés dans chaque puits de deux plaques 96 puits.

Environ 12 jours plus tard, les cellules ayant réussi à proliférer et former une colonie clonale sont visibles au microscope. Tous les puits contenant aucune ou plus d'une colonie sont écartés. Une fois que les cellules ont atteint une confluence de 70-80 % par puits, les cellules sont repiquées en plaque 24 puits puis ensuite en plaque 6 puits dans le but de les amplifier avant de les congeler. Ce processus peut prendre jusqu'à 3-4 semaines (Figure I.5).

## **12 Extraction d'ADN et analyse de fragments**

### **12.1 Principe**

L'analyse de fragments est une technique qui permet de détecter des changements au niveau de la longueur d'une séquence d'ADN spécifique, amplifiée au préalable par PCR, permettant de détecter la présence ou l'absence d'indels (insertion/délétion) grâce à la présence d'un fluorochrome couplé à l'une des amorces de PCR (FAM). Bien que la séquence du gène ne soit pas directement analysée, la présence d'un allèle mutant peut être déduite par comparaison avec une lignée possédant le gène sauvage (lignée non transduite). De plus, cette méthode permet de déterminer si la mutation s'est faite de manière homozygote (un pic) ou hétérozygote (2 pics ou plus).

#### 12.1.1 Extraction d'ADN

Le milieu des puits est décanté et 500 µL de PBS sont ajoutés pour racler et récupérer les cellules. Le tout est récolté dans des microtubes de 1,5 mL et mis à centrifuger pendant 5 minutes à 1000 rpm pour culoter les cellules. Le surnageant est décanté et le culot contenu



**Tableau II.21 : Extraction d'ADN – Matériel et réactifs**

Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nuclei Lysis Solution</li> <li>- RNase Solution</li> <li>- Protein Precipitation Solution</li> <li>- DNA Rehydration Solution</li> </ul>
Ethanol 70 % (Fisher Scientific, USA)	
Isopropanol (Merck, Germany)	

**Tableau II.22 : Amplification d'ADN – Matériel et réactifs**

Plaque 96 puits (Applied Biosystems, USA)		
Gotaq PCR Master Mix (Promega, USA)		
Buffer 5X (Roche, USA)		
dNTPs mix (Roche, USA)		
Thermocycler (Eppendorf, Germany)		
Amorces forward (F) et reverse (R) (Integrated DNA Technologies, USA)		
TMEM45A-1	F	FAM-CTGCTGGTTTTGGTCGTCTT
	R	TGGGGCCTCTAGTTAATGTACC
TMEM45A-4	F	FAM- TTCTTTGGGCTGTTGGGTGT
	R	TGAAGGGCTACATAAATGCTCAC

**Tableau II.23 : Analyse de fragments – Matériel et réactifs**

Plaque 96 puits (Applied Biosystems, USA)
Formamide (Sigma-Aldrich, USA)
LIZ 500 (Applied Biosystems, USA)
Gene Analyser ABI 3130 XL (Applied Biosystems, USA)



dans le tube est conservé à -70°C. Afin d'extraire l'ADN des cellules, 600 µL de Nuclei Lysis Solution sont ajoutés pour resuspendre le culot. Ensuite, 3 µL de RNase Solution ajoutés et les lysats sont incubés pendant 15 à 30 minutes à 37°C. Après l'incubation, il faut attendre que le lysat refroidisse à température ambiante avant d'y ajouter 200 µL de Protein Precipitation Solution et de les vortexer 20 sec à pleine puissance. L'échantillon est ensuite incubé pendant 5 minutes à 4°C puis centrifugé pendant 4 minutes à 13 000 rpm. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et placé dans un nouveau tube contenant 600 µL d'isopropanol et le tout est mixé doucement par inversion avant d'être remis à centrifugé pendant 1 minute à 13 000 rpm. Le surnageant est décanté et 600 µL d'éthanol 70 % sont ajoutés avant de resubir une étape de centrifugation similaire à la précédente. Le surnageant est retiré pour laisser sécher le culot pendant environ 15 minutes. Après le temps d'attente, 20 µL de DNA Rehydration Solution sont ajoutés et les échantillons sont incubés durant toute la nuit à 4°C (Tableau II.21).

### 12.1.2 Amplification par PCR

Les échantillons d'ADN sont dilués dans de l'eau MilliQ afin d'avoir 20 ng d'ADN. La réaction d'amplification est effectuée dans des plaques 96 puits avec les 20 ng d'ADN et 48 µL d'un mix contenant du tampon 1X, 300 nM d'amorces, 200 nM de dNTPs et 0,25 µL de la Taq polymérase. Une fois les puits remplis, la plaque est scellée et centrifugée 1 minute à 600 rpm.

Les conditions de cyclage thermique sont composées d'une étape initiale d'activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 30 secondes et 60°C pendant 60 secondes (Tableau II.22).

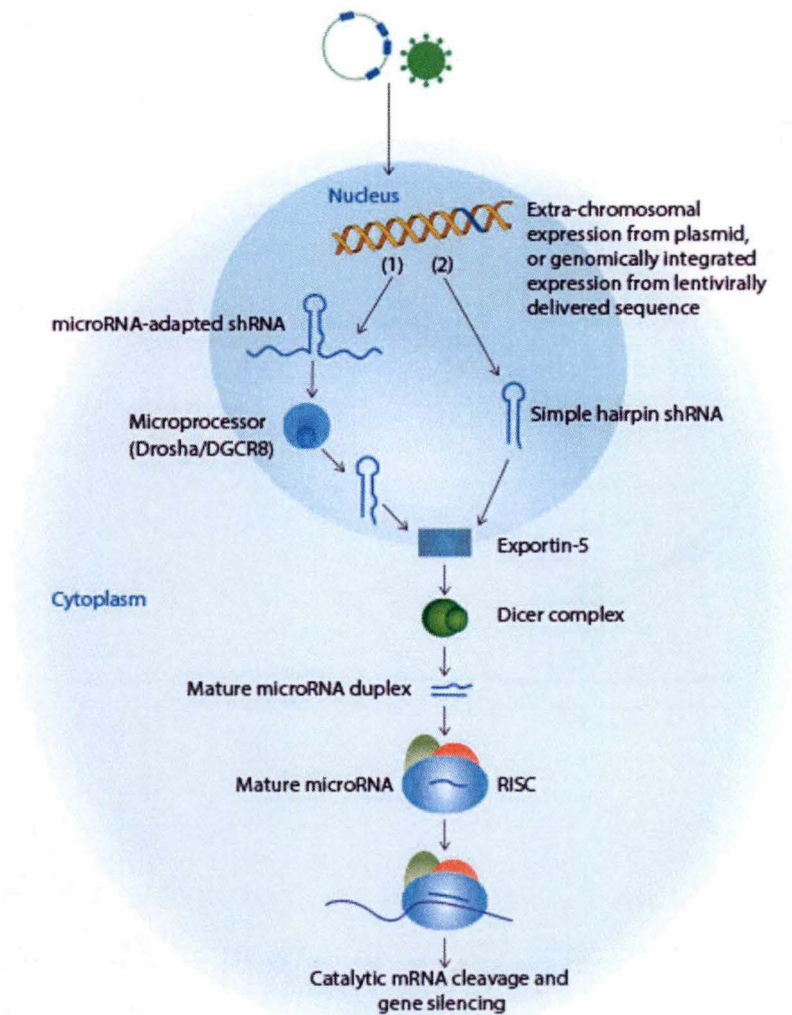
### 12.1.3 Analyse de fragments

La plaque de 96 puits est préparée avec 10 µL par puits de mix contenant 9,8 µL de formamide pour maintenir les amplicons dénaturés, 0,2 µL de LIZ 500, qui le marqueur de taille et 2 µL de produit de PCR dilué au 50<sup>ème</sup> sont ajoutés par puits. La plaque est alors placée dans le Gene Analyser ABI 3130 XL qui permet de discriminer les amplicons en fonction de leur taille par migration sur gel capillaire et par lecture de fluorescence des brins marqués par le fluorochrome FAM (principe du séquençage Sanger). On pourra ainsi déterminer le génotype de chaque clone en fonction de la taille des amplicons obtenus (Tableau II. 23).



### III. RÉSULTATS





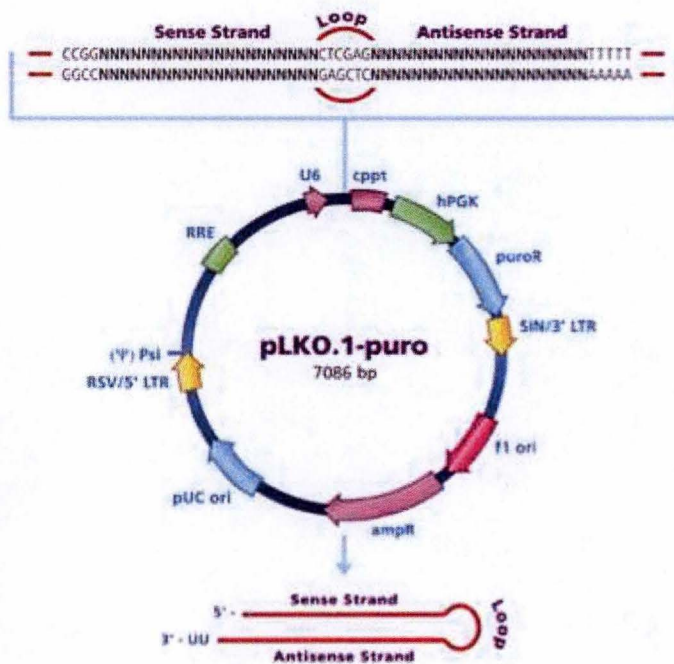
**Figure III.1 : Principe de l'inactivation par les shARN.**

L'entrée des shARN seuls ou inclus dans un miARN (miARN-shARN) se fait par transduction d'un vecteur viral dans la cellule hôte. Le matériel génétique est alors transféré dans le noyau et intégré dans l'ADN génomique pour être transcrit. Le shARNtranscrit est ensuite exporté vers le cytoplasme, où il est clivé par l'enzyme Dicer. La séquence courte double-brin résultante est libérée et incorporée dans le complexe RISC, qui libère alors un brin pour ne conserver que le brin complémentaire de l'ARNm cible. L'ARNm est dégradé par RISC après l'hybridation du shARN.

Dharmacon, "shRNA", <http://dharmacon.gelifesciences.com/rnai-and-custom-rna-synthesis/shrna/#all>



A



B

shRNA 22

CCGGGAGTTCCTTGTTCCGAACAATCTCTEAGATTGTTCCGAACAAGGAAC TCTTTTTTG

**Figure III.2 : Invalidation de l'expression de TMEM45A en utilisant un shARN dans les cellules RCC4 plus pVHL.**

Les cellules ont été transduites avec des particules pseudovirales contenant le vecteur pLKO.1-puro (A). La construction lentivirale s'intègre dans le génome de l'hôte et induit une expression stable du shARN 22 qui cible l'ARNm de TMEM45A. Le shARN 22 (B) est composé d'une boucle (séquence rouge) entre deux brins (séquences bleues) et se termine par les UTR 5' et 3' (séquences noires).



## 1 Modèle d'étude

Afin d'étudier le rôle de TMEM45A dans la chimiorésistance dans le RCC, les cellules RCC4 plus pVHL ont été utilisées comme modèle au cours de ce mémoire. Cette lignée cellulaire épithéliale est dérivée d'une tumeur primaire de ccRCC déficiente pour pVHL et est transfectée de manière stable avec le plasmide pcDNA3-VHL. Ce plasmide confère une résistance à la néomycine et permet de restaurer l'expression du gène suppresseur de tumeur *VHL* sauvage.

Grâce à l'existence des RCC4 déficientes pour pVHL et de sa lignée cellulaire homologue avec le gène *VHL* sauvage restauré, les cellules RCC4 sont souvent utilisées comme modèle pour étudier les mécanismes dépendant de pVHL tels que la régulation de HIF-1 $\alpha$  dans les cancer rénaux (Harten et al., 2011; Maxwell et al., 1999; Raval et al., 2005; Razorenova et al., 2011; Zhang et al., 2007). Il est également possible de les utiliser pour des expériences in vivo étant donné que les cellules RCC4 sont tumorigènes chez les souris nude (Harada et al., 2009). Malheureusement, aucune donnée sur le patient d'origine ne peut être trouvée. Il est supposé que les cellules ont été obtenues par le Prof. C.H.C.M. Buys, du Département de génétique médicale, Université de Groningen au Pays-Bas (Brodaczewska et al., 2016; Maxwell et al., 1999).

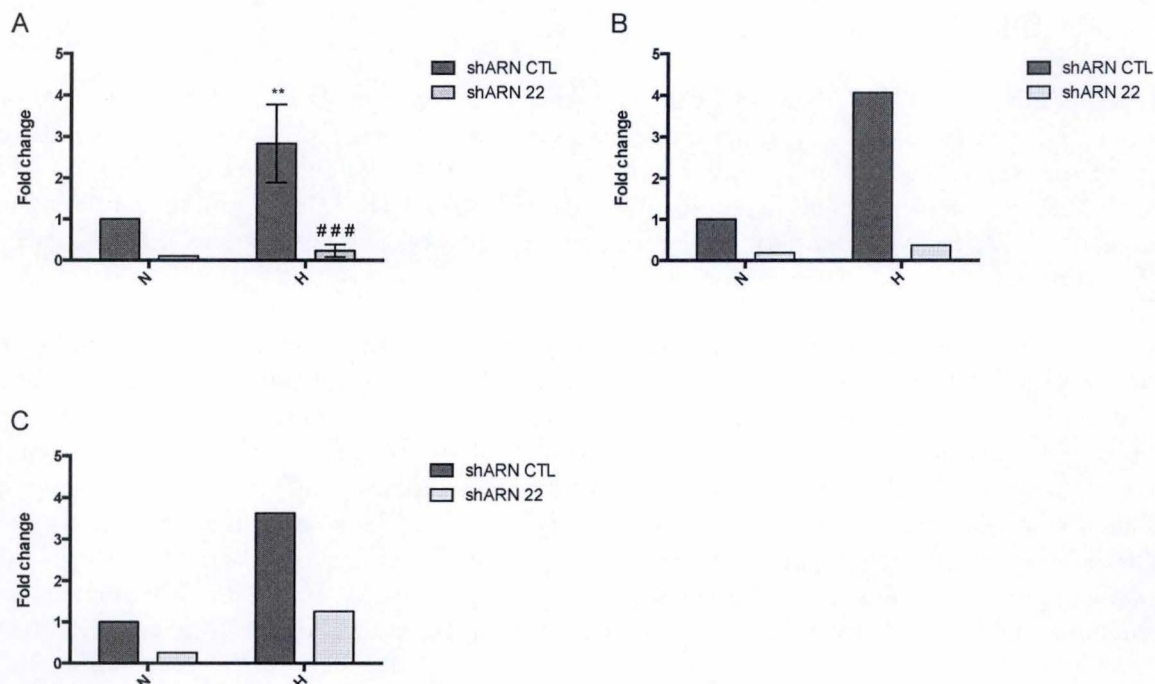
## 2 Invalidation de TMEM45A par la technique des shARN

La technique des shARN est une technique qui copie un mécanisme de régulation endogène de l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel. Celui-ci nécessite de courtes séquences doubles brins d'ARN qui ciblent un ARNm spécifiquement pour la dégradation ou l'inhibition de sa traduction en protéines. Il existe plusieurs méthodes pour l'introduction des shARN dans la cellule hôte mais les systèmes de délivrance viraux, tels que par des particules lentivirales, sont préférés pour le silençage de gène de longue durée (Apparailly and Jorgensen, 2013).

Une fois que le vecteur a été intégré dans le génome de l'hôte, le shARN est transcrit dans le noyau par la polymérase II ou III selon le promoteur utilisé. Le produit obtenu est reconnu comme un pri-miARN (micro-ARN) endogène et est pris en charge par la protéine Drosha et son co-facteur DGCR8 pour être converti en pré-miARN. Le pré-miARN est transporté hors du noyau par l'exportine 5 pour être ensuite pris en charge par le complexe Dicer. Ce dernier coupe le pré-microARN en miARN double brin d'environ 22 paires de bases. Pour la plupart des miARN, le brin anti-sens (le brin guide) est chargé dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) tandis que l'autre brin (le brin passager) est rapidement dégradé. Le brin guide dirige le complexe RISC vers les ARNm cibles possédant une séquence complémentaire, s'y hybride et induit la dégradation de l'ARNm cible (Manjunath et al., 2009) (Figure III.1).

Le rôle de TMEM45A dans la résistance induite par l'hypoxie aux agents chimiothérapeutiques dans les cellules RCC4 plus pVHL a été étudié par invalidation de son expression par des shARN. Les cellules ont été transduites avec des particules lentivirales conçues pour exprimer un shARN spécifique (Figure III.2 A): shARN sans cible en tant que contrôle négatif (shARN CTL) d'une part, et shARN ciblant l'ARNm TMEM45A (shARN 22) d'autre part (Figure III.2 B).





**Figure III.3 : Analyse de l'expression du gène TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL.**

Les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) ont été incubées en normoxie (N) ou hypoxie (H) pendant 48 heures et l'ARN total a été extrait, puis rétro-transcrit en ADNc. L'abondance relative de l'ARNm TMEM45A a été quantifiée par RT-qPCR en utilisant 23 kDa comme gène de référence, aux passages post-transduction précoce (A), intermédiaire (B) et tardif (C). Les résultats sont exprimés en fold change après normalisation à la condition de référence (shARN CTL, N). Pour le PPT précoce (A), les résultats proviennent de trois réplicats biologiques indépendants et sont analysés statistiquement par une ANOVA 2.

\* H vs N correspondant

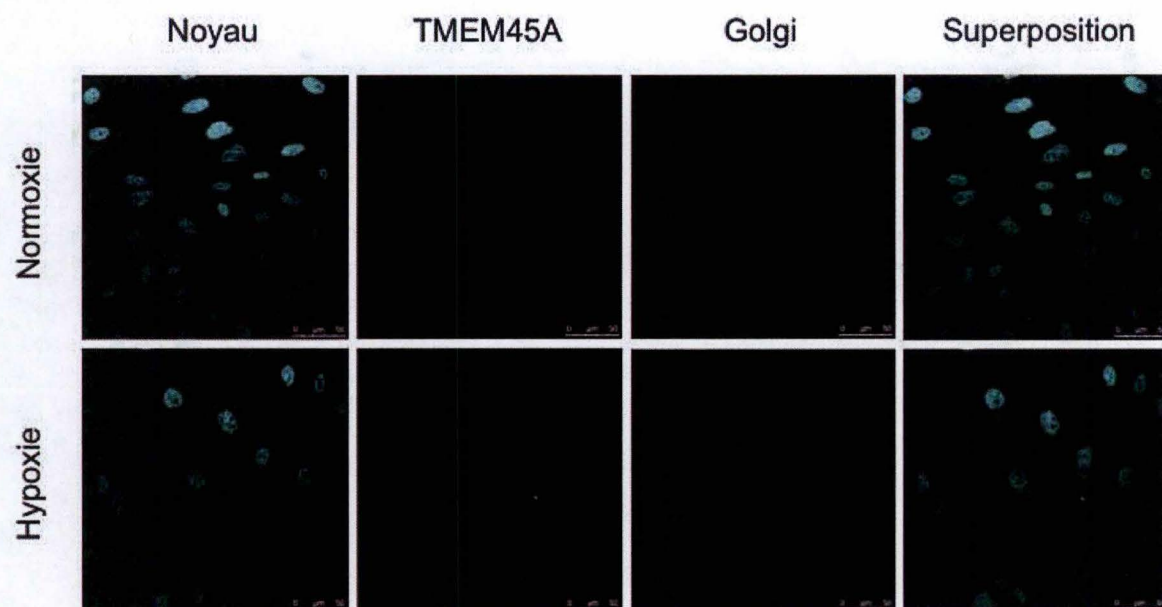
# shARN 22 vs shARN CTL correspondant

\*  $p < 0,005$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

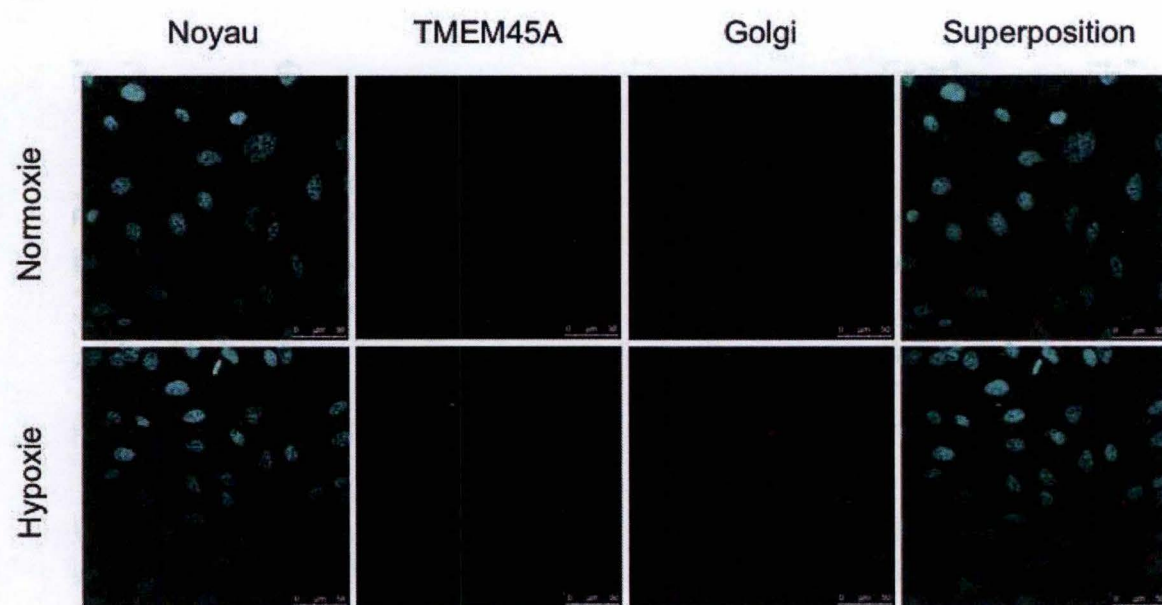
#  $p < 0,005$  ; ##  $p < 0,01$  ; ###  $p < 0,001$



**A**

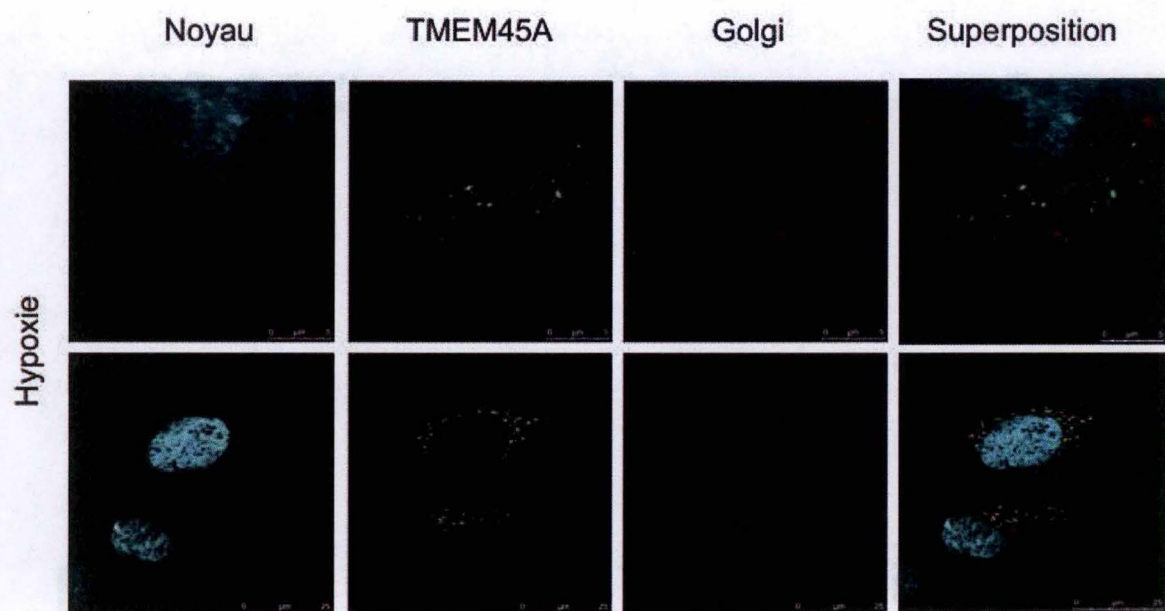


**B**



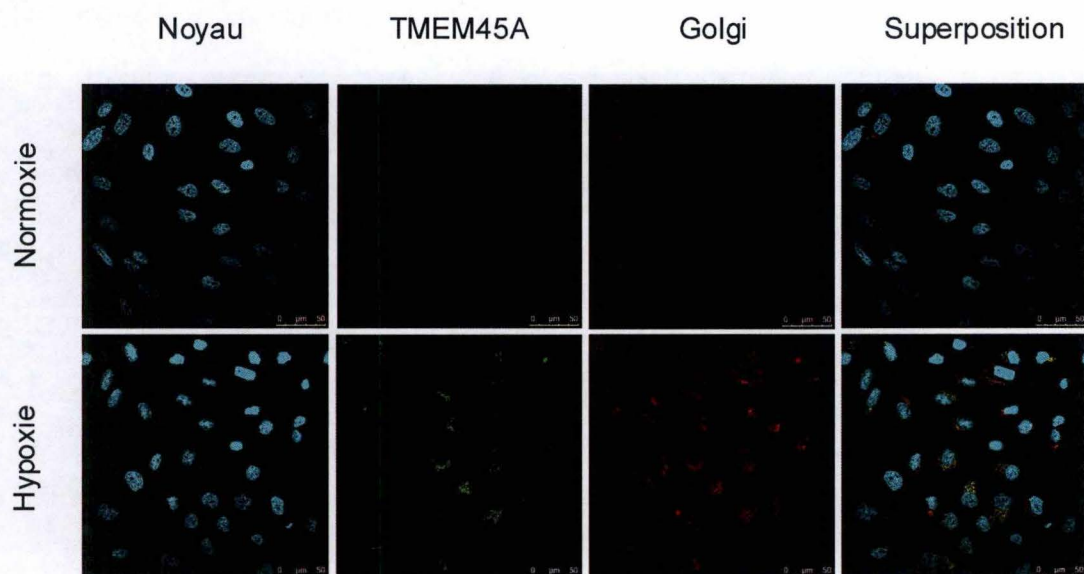


C

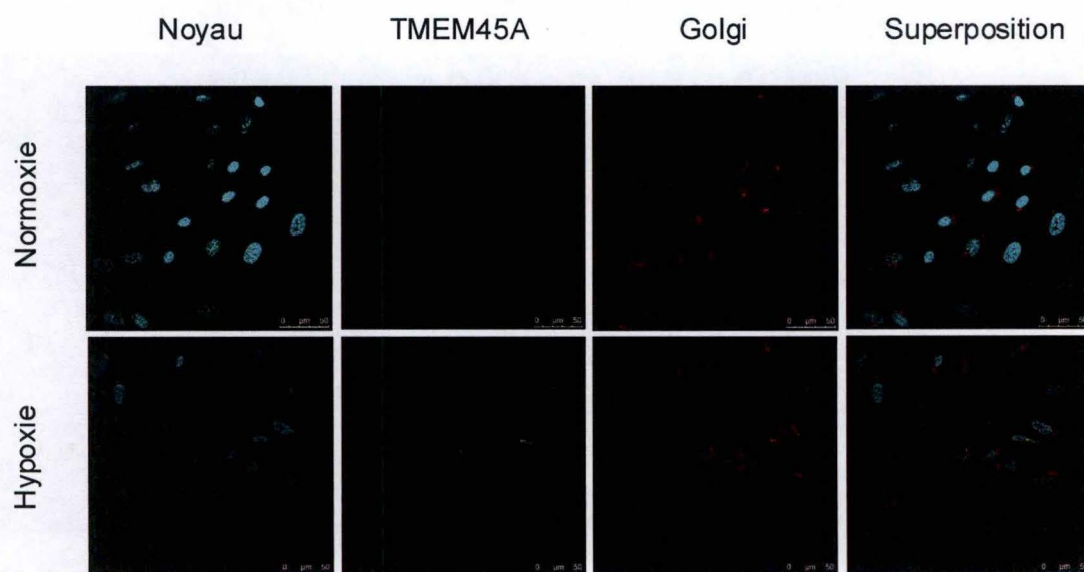




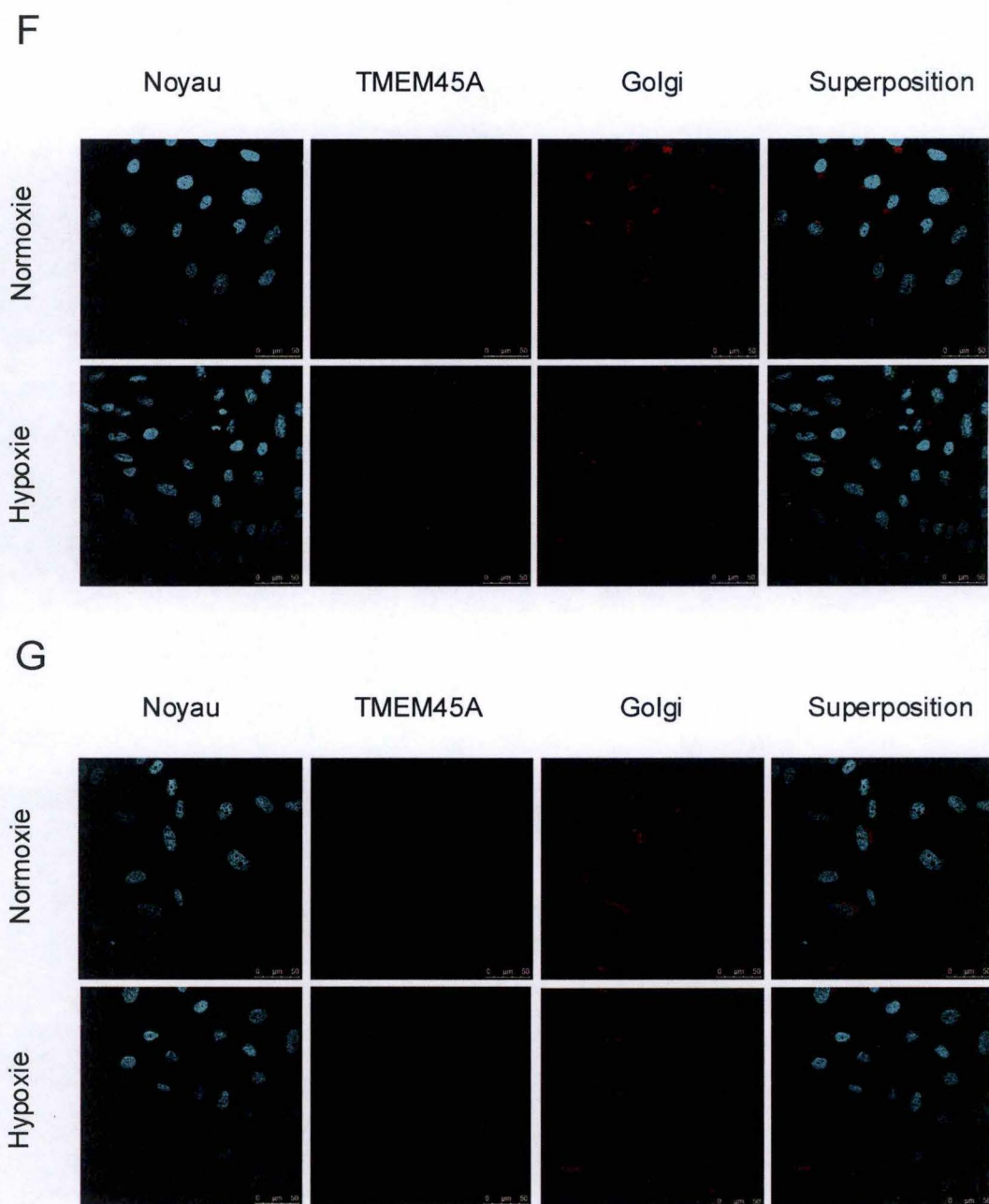
D



E







**Figure III.4 : Analyse de l'expression de la protéine TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL.**

Les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) ont été ensemencées sur lamelles de verre et incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 48 heures. Les marquages par immunofluorescence des cellules shARN CTL (A, C, D et F) et shARN 22 (B, E et G) ont été réalisés à des passages post-transduction précoce (A et B), intermédiaire (C et D) et tardif (E et F). TMEM45A a été détectée par microscopie confocale en utilisant l'anticorps monoclonal anti-TMEM45A et l'anticorps anti-lapin Alexa 488. Le Golgi a été marqué avec l'anti-golgin97 et l'anticorps anti-souris Alexa 568. Le noyau est détecté par marquage avec Hoechst. Barres d'échelle: 5 et 25  $\mu\text{m}$  (C), et 50  $\mu\text{m}$  (A-G).



## 2.1 Analyse des expressions génique et protéique de TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A

La première étape de cette étude consistait à évaluer l'efficacité de l'invalidation de *TMEM45A* par le shARN 22. Cela a été analysé premièrement au niveau transcriptionnel et ensuite au niveau de l'abondance protéique à des passages post-transduction (PPT) précoce (1 à 6), intermédiaire (7 à 12) et tardif (à partir de 13).

L'abondance relative d'ARNm a été quantifiée par RT-qPCR en utilisant 23 kDa comme gène de référence. Pour les deux lignées cellulaires exprimant le shARN CTL ou le shARN 22, l'extraction des ARN a été effectuée après 48 heures d'incubation en conditions de normoxie ou d'hypoxie à différents PPT. Pour chaque PPT analysé (Figure III.3), le niveau d'ARNm *TMEM45A* dans les cellules shARN CTL incubées en hypoxie est d'environ 4 fois supérieur par rapport aux cellules incubées en normoxie. Une diminution de l'expression de l'ARNm *TMEM45A* est observée dans les cellules invalidées dans les deux conditions, mais dans une moindre mesure en hypoxie. Cependant, à PPT tardif (Figure III.3 C), l'efficacité de l'invalidation semble moins marquée. En effet, les résultats montrent une diminution de l'expression de l'ARNm *TMEM45A* de 65 % comparé à environ 90 % à PPT précoce (Figure III.3 A) et intermédiaire (Figure III.3 B) pour les cellules incubées en conditions hypoxiques. La même tendance a également été observée en conditions normoxiques.

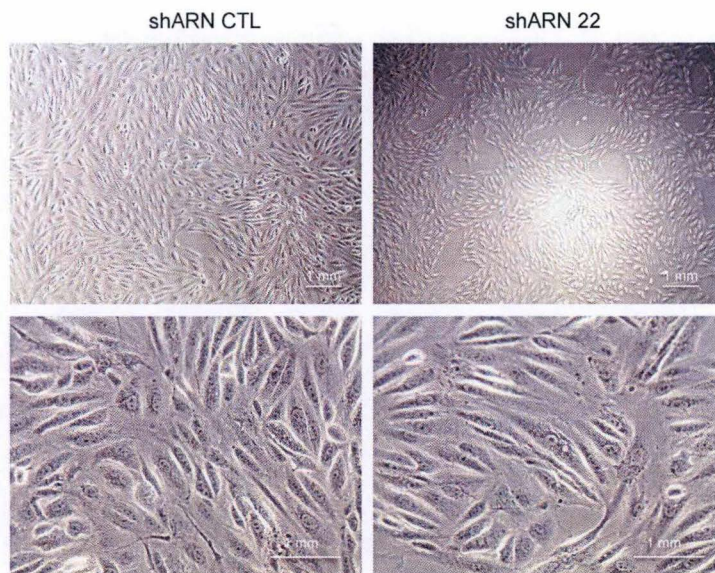
En ce qui concerne l'expression de la protéine, un marquage par immunofluorescence a été effectué pour les deux lignées cellulaires après 48 heures d'incubation en normoxie ou en hypoxie afin d'évaluer le niveau d'expression de la protéine *TMEM45A*. Les résultats montrent des profils d'expression de protéines cohérents avec ceux obtenus pour l'ARNm en fonction du PPT. En effet, pour chaque PPT analysé (Figure III.4) dans les cellules shARN CTL, *TMEM45A* est faiblement exprimée dans les cellules exposées à des conditions normoxiques alors que son expression augmente considérablement dans des conditions hypoxiques. En outre, le marquage met en évidence l'expression de la protéine autour du noyau et son association avec l'appareil de Golgi comme le montre la co-localisation de *TMEM45A* avec la golgin-97, un marqueur spécifique du Golgi (Figure III.4 C). Dans les cellules shARN 22, la présence de *TMEM45A* n'est pas détectable en raison de son invalidation mais certaines images montrent tout de même quelques cellules exprimant plutôt fortement *TMEM45A*. Toutefois, à passage précoce (Figure III.4 B), ces cellules représentent seulement 11 % de la population des cellules shARN 22 tandis qu'à PPT intermédiaire (Figure III.4 E), ce pourcentage augmente à 19 %. Au PPT tardif (Figure III.4 G), cette partie de la population devient plus élevée et atteint même 24 % des cellules shARN 22.

Pris ensemble, ces résultats indiquent une invalidation efficace mais non totale de *TMEM45A* dans des cellules transduites avec le shARN 22, ainsi qu'une perte de l'invalidation au cours du temps. Ils confirment également l'expression différentielle de *TMEM45A* en fonction du microenvironnement et l'association de la protéine avec l'appareil de Golgi situé autour du noyau.

Pour la suite du projet, les expériences ont été réalisées en triplicat biologique uniquement à PPT **précoces**, condition pour une invalidation importante de *TMEM45A*. Chaque réplicat biologique est donc réalisé avec une transduction différente.

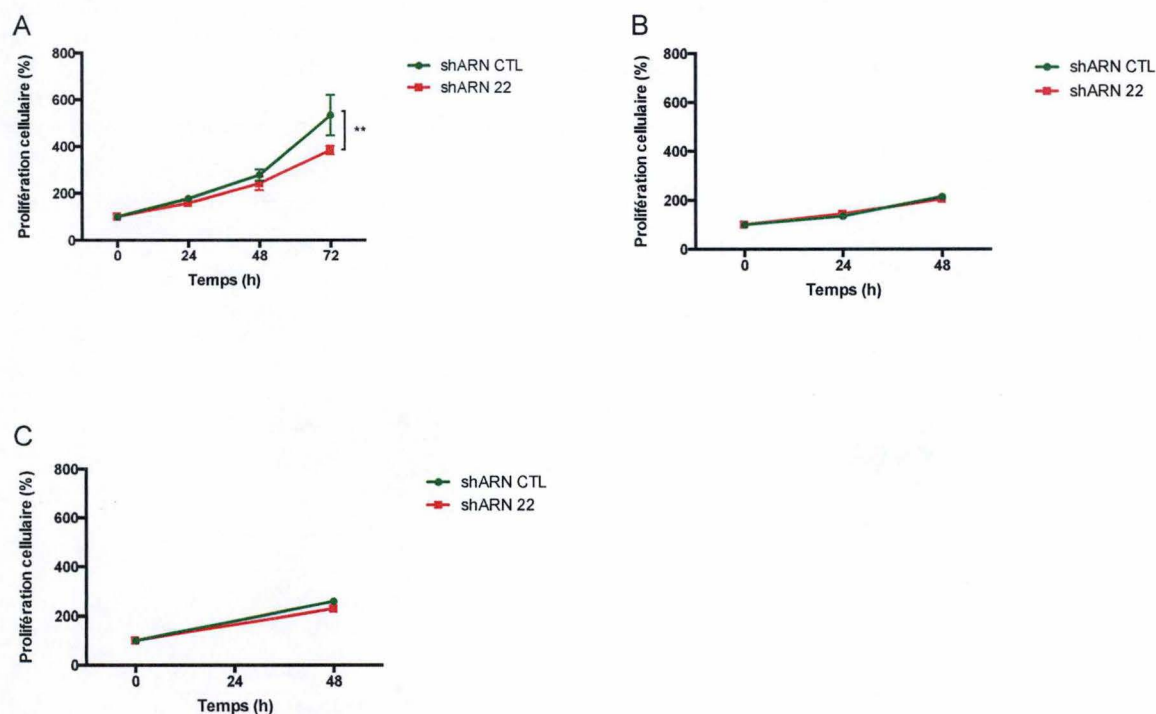
IF la read out pour invalidation.





**Figure III.5 : Analyse de la morphologie des cellules RCC4 plus pVHL.**

Comparaison morphologique des cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) par images prises au microscope à contraste de phase avec des grossissements de x10 et x200.



**Figure III.6 : Effet de l'inactivation de TMEM45A sur la prolifération des cellules RCC4 plus pVHL**

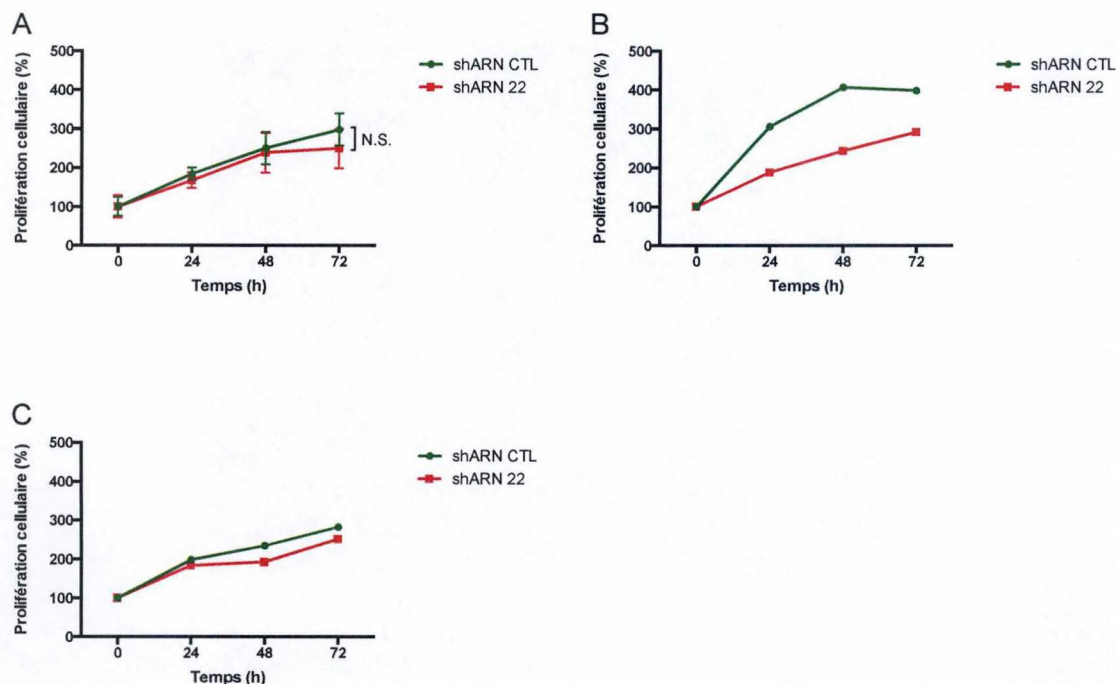
Le nombre de cellules vivantes a été évalué pour les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) en effectuant un test MTT à différents temps d'incubation (0, 24, 48 et 72 heures) aux passages post-transduction précoce (A), intermédiaire (B) et tardif (C). Les résultats du taux de prolifération ont été normalisés au nombre de cellules au temps 0 heure (100%) et sont exprimés par la moyenne de 3 réplicats techniques.

Pour le PPT précoce (A), les résultats proviennent de trois réplicats biologiques indépendants et sont analysés statistiquement par une ANOVA 2.

\* shARN 22 vs shARN CTL correspondant

\*  $p < 0,005$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$



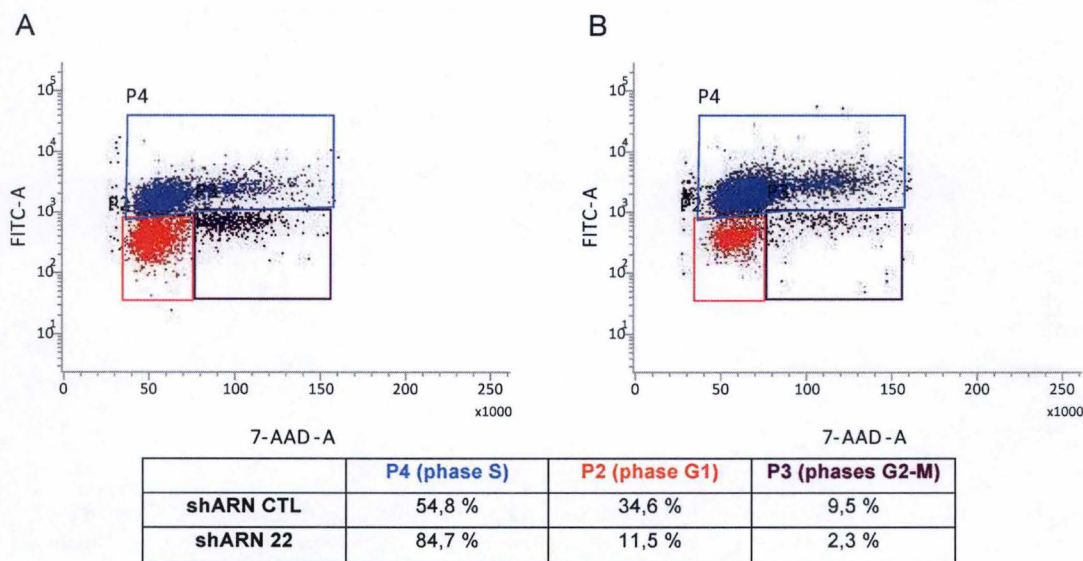


**Figure III.7 : Effet de l'invalidation de TMEM45A sur la prolifération des cellules RCC4 plus pVHL.**

Le nombre de cellules a été évalué sur les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) par comptage cellulaire à différents temps d'incubation (0, 24, 48 et 72 heures) aux passages post-transduction précoce (A), intermédiaire (B) et tardif (C). Les résultats du taux de prolifération ont été normalisés au nombre de cellules au temps 0 heure (100 %) et sont exprimés par la moyenne de 4 réplicats techniques.

Pour le PPT précoce (A), les résultats proviennent de trois réplicats biologiques indépendants et sont analysés statistiquement par une ANOVA 2.

N.S. = non significatif



**Figure III.8 : Effet de l'invalidation de TMEM45A sur le cycle cellulaire des cellules RCC4 plus pVHL.**

Le cycle cellulaire des cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) (A) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) (B) a été évalué par analyse de cytométrie en flux à passage post-transduction précoce. 48 heures après l'ensemencement, les cellules sont incubées 45 minutes en présence de BrdU. Pour l'analyse au FACS, le BrdU est mis en évidence avec un anticorps anti-BrdU conjugué au fluorochrome FITC et l'ADN est marqué par le 7-AAD.



## 2.2 Caractérisation des cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A

L'étape suivante de l'étude consistait à caractériser le phénotype des cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour *TMEM45A* en les comparant aux cellules transduites avec le shARN CTL. L'analyse des caractéristiques s'est portée sur la morphologie des cellules, leur prolifération et leur cycle cellulaire.

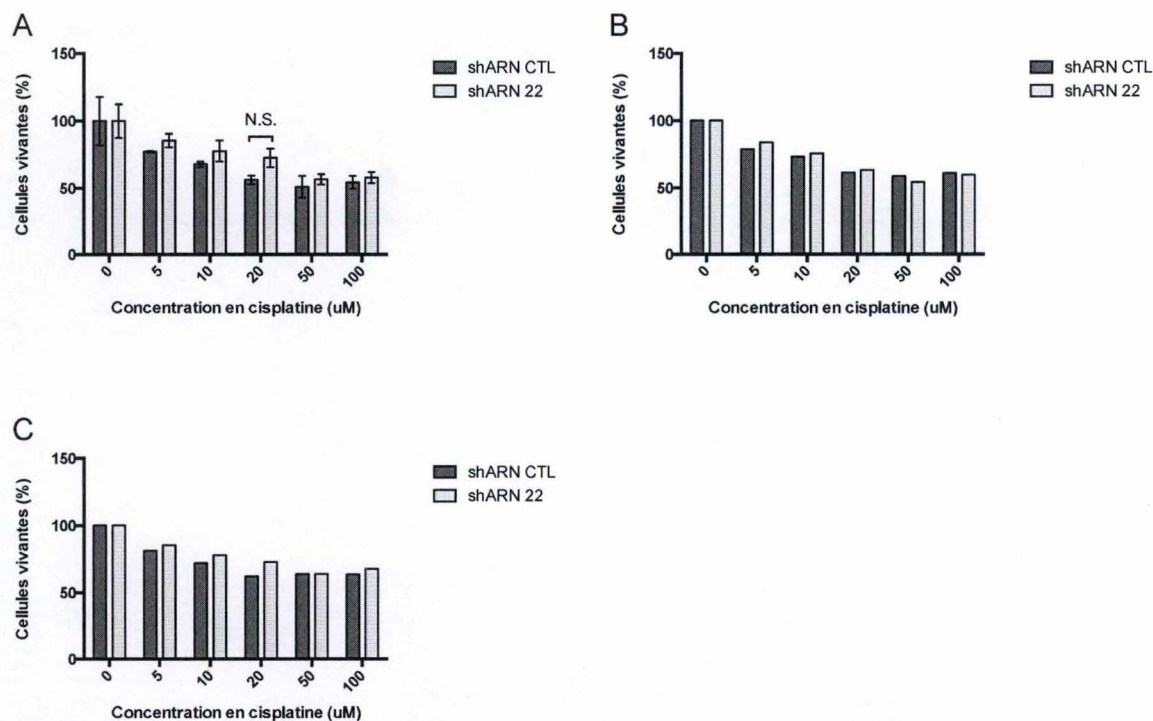
Au niveau morphologique, aucune différence n'a été remarquée. Les deux lignées cellulaires présentaient des cellules allongées et en forme de fuseau (Figure III.5).

Cependant, une différence au niveau de la prolifération a été observée. Pour analyser le taux de prolifération, des tests MTT ont été effectués pour suivre le nombre de cellules vivantes au cours du temps (à 0, 24, 48 et 72 heures après ensemencement des cellules) et ce à différents PPT sur les deux lignées cellulaires. Les résultats indiquent une diminution significative de la prolifération dans les cellules shARN 22 par rapport aux cellules shARN CTL à PPT précoce (Figure III.6 A). Pour les PPT intermédiaire (Figure III.6 B) et tardif (Figure III.6 C), la différence du taux de prolifération entre les deux lignées cellulaires était moins prononcée. Cependant, ces résultats à PPT intermédiaire n'étaient pas attendus car ils n'étaient pas représentatifs de ce que nous avons observé pendant le maintien de la culture. En effet, les cellules shARN 22 présentaient encore un taux de prolifération plus faible, car les cellules étaient moins confluentes par rapport aux cellules shARN CTL même lorsqu'elles étaient diluées à la même densité. Une autre méthode a donc été utilisée pour étudier le taux de prolifération dans ces cellules. Le comptage cellulaire manuel a été effectué sur les deux lignées cellulaires à 0, 24, 48 et 72 heures après ensemencement pour différents PPT. Les résultats montrent une légère inhibition de la prolifération cellulaire dans les cellules shARN 22 à PPT précoce (Figure III.7 A) et une inhibition encore plus marquée à PPT intermédiaire (Figure III.7 B). Néanmoins, cette inhibition semble diminuer après, pour pratiquement disparaître à PPT tardif (Figure III.7 C).

Afin d'analyser les différentes phases du cycle cellulaire, une analyse en cytométrie de flux a été effectuée sur les cellules shARN CTL et shARN 22 48 heures après ensemencement, avec une incorporation de BrdU et un marquage au 7-AAD. Le BrdU est un nucléoside synthétique qui peut être incorporé dans l'ADN à la place de la thymidine au cours de la réplication des cellules, révélant ainsi les cellules en phase S du cycle cellulaire. Le 7-AAD est quant à lui une molécule fluorescente s'intercalant entre l'ADN double brin. Les résultats montrent des différences au niveau de la répartition des deux lignées cellulaires dans les différentes phases du cycle cellulaire (Figure III.8). Les cellules shARN CTL (Figure III.8 A) montrent que plus de la moitié de leur population se trouve en phase S, seulement 9,5 % sont en phase G2-M et près de 35 % en phase G1. Pour les shARN 22 (Figure III.8 B), quasi l'entièreté de la population est en phase de synthèse de l'ADN tandis qu'à peine 2,3 % et 11,5 % se trouvent en phases G2-M et G1 respectivement.

Ensemble, ces résultats indiquent une diminution de prolifération dans les cellules invalidées pour *TMEM45A* comparées aux cellules contrôles, probablement due à un ralentissement du cycle cellulaire et à une accumulation des cellules shARN 22 en phase S du cycle cellulaire. Cette inhibition de la prolifération semble néanmoins s'estomper au fil des PPT.



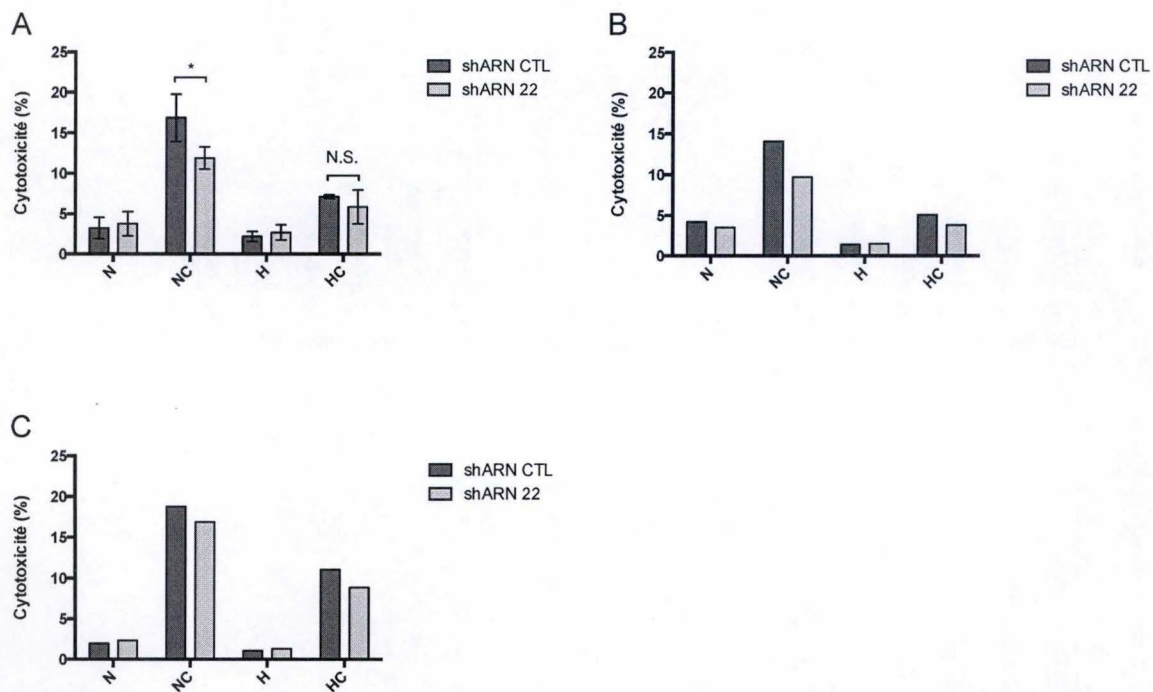


**Figure III.9 : Analyse de la sensibilité des cellules RCC4 plus pVHL au cisplatine.**

Le nombre de cellules vivantes a été évalué pour les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) en effectuant un test MTT après 48 heures d'incubation en présence de différentes concentrations de cisplatine (de 0 à 100 μM) aux passages post-transduction précoce (A), intermédiaire (B) et tardif (C). Les résultats ont été normalisés par le nombre de cellules vivantes au temps 0 heure (100 %) et sont exprimés par la moyenne de 3 réplicats techniques. Pour le PPT précoce (A), les résultats proviennent de trois réplicats biologiques indépendants et sont analysés statistiquement par une ANOVA 2.

N.S. = non significatif







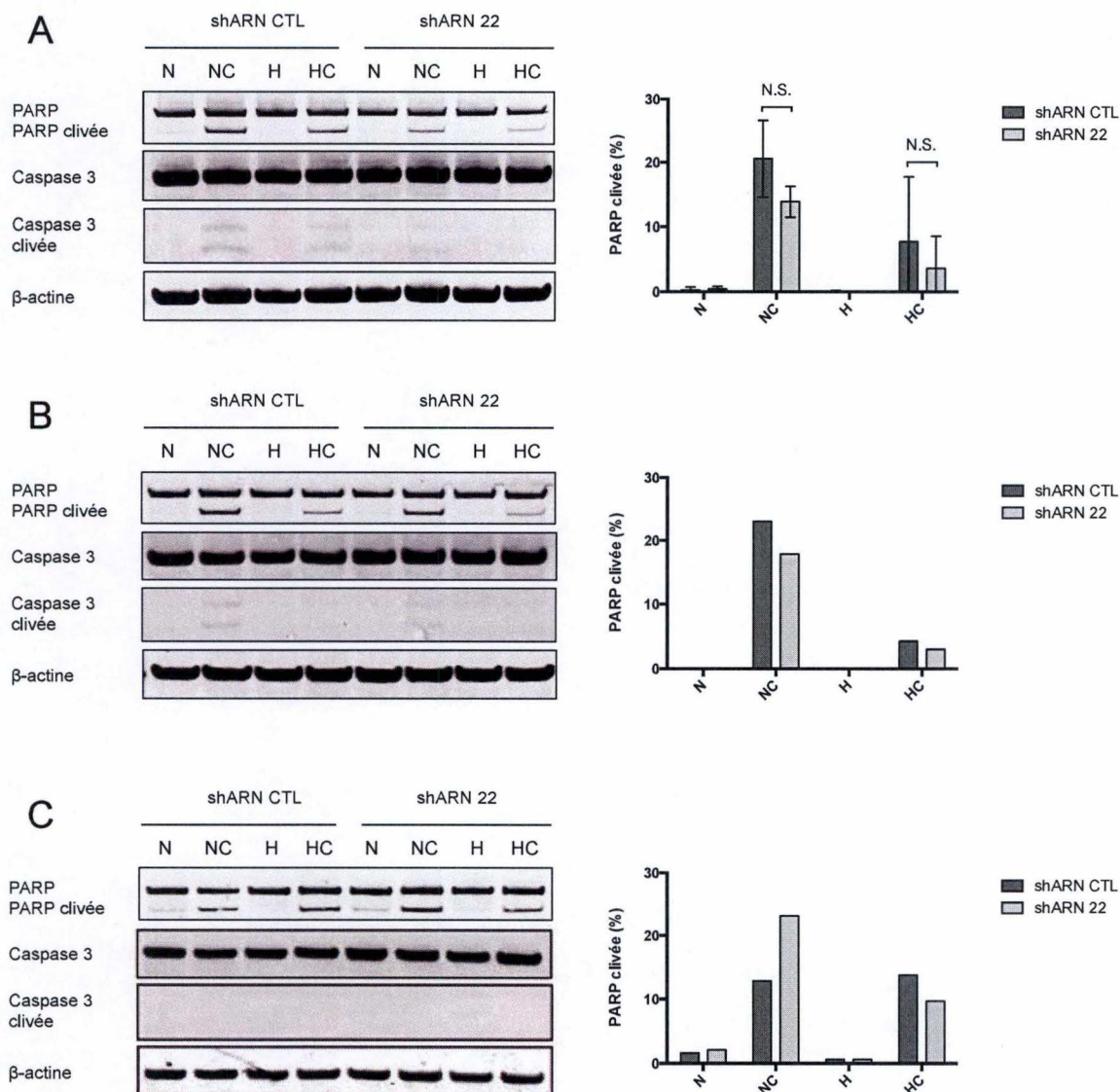
### 2.3 Analyse de la sensibilité au cisplatine des cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour TMEM45A

Il a été montré que TMEM45A joue un rôle majeur dans la chimiorésistance induite par l'hypoxie en inhibant l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Flamant et al., 2012). Afin d'étudier l'implication de TMEM45A dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses rénales, la sensibilité des cellules RCC4 plus pVHL a été évaluée en utilisant le cisplatine, un médicament chimiothérapeutique utilisé dans de nombreux cancers à cause de ses propriétés cytotoxiques. Son mode d'action repose sur sa capacité à se lier aux bases puriques de l'ADN. Le cisplatine interfère avec les mécanismes de réparation de l'ADN, causant des dommages, et induisant par la suite l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Guo et al., 2015b). Bien que le sunitinib soit considéré comme l'un des traitements standards pour les RCC (Hsieh et al., 2017), ce médicament n'a pas été choisi pour cette étude. En effet, des expériences antérieures menées dans notre laboratoire ont montré que le sunitinib exerçait un effet cytostatique à de faibles concentrations mais induisait une mortalité élevée à des concentrations plus élevées d'une manière non reproductible (données non présentées). Ce médicament n'a donc pas été utilisé pour évaluer la sensibilité des cellules à la chimiothérapie.

Le premier objectif était d'étudier le rôle de TMEM45A dans la sensibilité des cellules RCC4 plus pVHL shARN 22 par rapport aux shARN CTL face au cisplatine et d'établir la concentration d'incubation adéquate pour les expériences ultérieures. Les cellules ont été incubées avec différentes concentrations de cisplatine variant de 0 à 100  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures en normoxie. Des tests MTT ont ensuite été effectués sur les deux lignées cellulaires à différents PPT pour analyser le taux de cellules vivantes (Figure III.9). De façon surprenante, au PPT précoce (Figure III.9 A), les résultats montrent des pourcentages de cellules vivantes plus élevés dans les cellules shARN 22 que les cellules shARN CTL pour chaque concentration du médicament, en particulier à 20  $\mu\text{M}$  où il y a une différence de 17 % du nombre de cellules vivantes entre les deux lignées. Cependant, la différence de sensibilité semble beaucoup moins marquée aux PPT intermédiaire (Figure III.9 B) et tardif (Figure III.9 C). Ces résultats suggèrent une résistance accrue au cisplatine des cellules shARN 22 par rapport aux cellules shARN CTL, malgré l'invalidation de TMEM45A dans les premières. Il est également intéressant de noter qu'à partir d'une concentration de 20  $\mu\text{M}$ , les effets du médicament semblent atteindre un plateau, tuant environ 50 % des cellules à cette dose. Une incubation en présence de cisplatine à 20  $\mu\text{M}$  pendant 48 heures a de ce fait été choisie pour les expériences suivantes.

Des mesures de relargage de la LDH visant à analyser la cytotoxicité du cisplatine sur les cellules ont également été réalisées. Les cellules RCC4 plus pVHL shARN CTL et shARN 22 ont été incubées en normoxie ou en hypoxie, avec ou sans cisplatine à 20  $\mu\text{M}$ , à des PPT précoce, intermédiaire et tardif. Comme dans l'expérience précédente, les résultats montrent des pourcentages beaucoup plus élevés de cytotoxicité pour les cellules incubées en présence de cisplatine (Figure III.10). Pour tous les PPT analysés, les cellules shARN 22 semblent être moins sensibles au cisplatine que les cellules shARN CTL tant en normoxie qu'en hypoxie car le taux de mort cellulaire est moins important dans les cellules invalidées pour TMEM45A. A partir du PPT intermédiaire (Figure III.10 B-C), la différence de sensibilité au cisplatine semble néanmoins s'estomper au fil des PPT. Ces résultats correspondent à ceux obtenus dans les tests MTT. De plus, le pourcentage inférieur de mort cellulaire pour les deux lignées cellulaires incubées avec le cisplatine en hypoxie comparé à celui en normoxie permet de mettre en évidence la protection conférée par l'hypoxie contre l'effet du cisplatine.





**Figure III.11 : Analyse de la sensibilité des cellules RCC4 plus pVHL au cisplatine.**

Les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) ont été incubées en normoxie (N) ou hypoxie (H) pendant 48 heures avec ou sans cisplatine à 20  $\mu$ M. La lyse cellulaire pour l'extraction totale de protéines a été réalisée sur des cellules aux passages post-transduction précoce (A), intermédiaire (B) et tardif (C). Les abondances relatives de PARP clivée et de la caspase 3 clivée ont été analysées par western blot avec la  $\beta$ -actine comme témoin de charge. Les résultats sont exprimés en abondance relative de PARP clivée en comparaison avec l'abondance de la protéine non clivée.

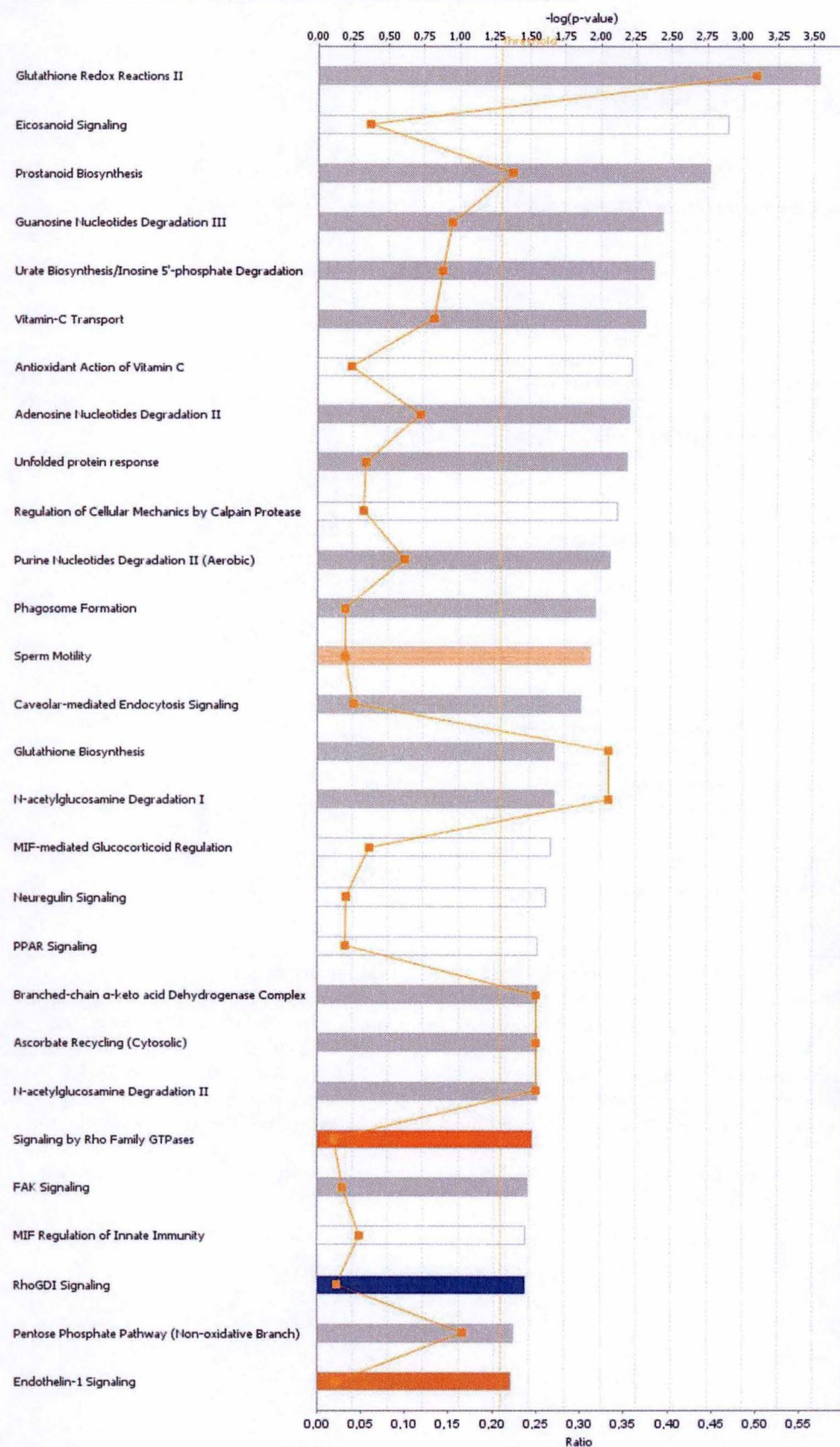
Pour le PPT précoce (A), les résultats proviennent de trois réplicats biologiques indépendants et sont analysés statistiquement par une ANOVA 2.

N.S. = non significatif



Analysis: Ctrl-G2 (shCtrl N - sh22 N)

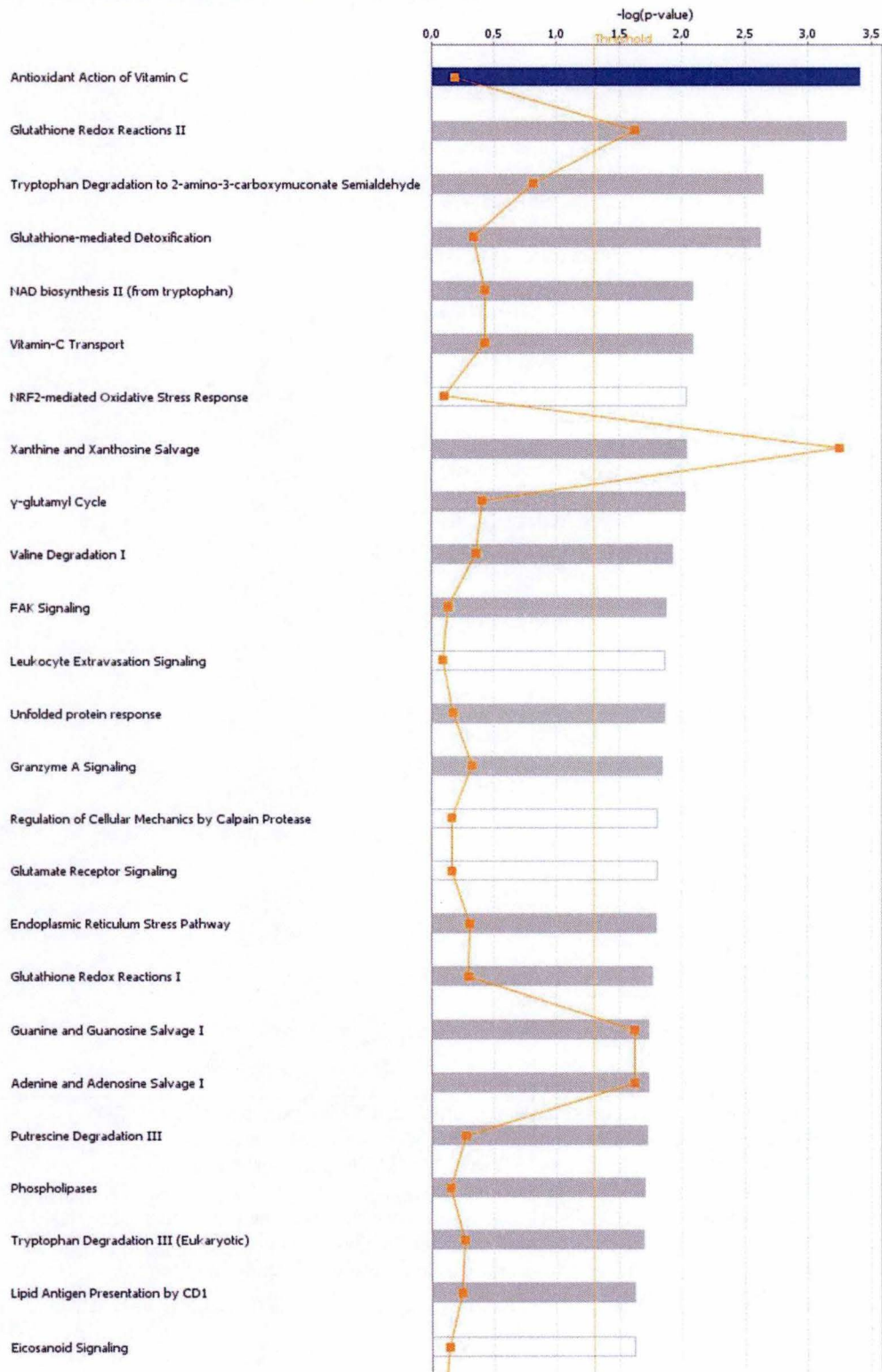
positive z-score   z-score = 0   negative z-score   no activity pattern available   Ratio





Analysis: G1-G3 (shCtrl NC - sh22 NC)

positive z-score    z-score = 0    negative z-score    no activity pattern available    Ratio







© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

**Figure III.12 : Voies de signalisation mises en évidence par analyse RNA-seq sur les cellules SOD9.**

Le profil d'expression de gènes des cellules SOD9 transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) ont été analysées par RNA-sequencing. Par comparaison des cellules shARN 22 avec les cellules shARN CTL, des voies de signalisation dérégulées en conditions de normoxie sans cisplatine (N) ou en présence de cisplatine (NC) ont pu être mises en évidence à l'aide du logiciel IPA. Le graphique montre pour chaque voie de signalisation le z-score (bâtonnet positif en orange, nul en blanc, négatif en bleu ou sans motif d'activité disponible en gris) et le ratio exprimé en logarithme (carré orange) (K. Schmit, résultats non publiés).



Par la suite, l'apoptose a été étudiée par des analyses en western blot du clivage de la caspase 3 et de PARP, deux marqueurs des voies apoptotiques. Les deux lignées cellulaires provenant de différents PPT ont été incubées en présence de cisplatine dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente. A PPT précoce (Figure III.11 A), des bandes correspondant à la protéine PARP clivée pour les cellules incubées avec le cisplatine ont été observées dans les cellules shARN CTL et les shARN 22, indiquant l'activation de l'apoptose dans les deux lignées cellulaires. En outre, les quantifications pour les cellules incubées avec le cisplatine montrent des pourcentages d'abondance relative de PARP clivée plus élevés dans les cellules shARN CTL que dans les cellules shARN 22 en conditions normoxiques, indiquant une plus grande sensibilité dans les cellules contrôles, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par les expériences précédentes. Des pourcentages plus élevés de PARP clivée ont également été observés en normoxie qu'en hypoxie, mettant en évidence les effets protecteurs conférés par l'hypoxie contre le cisplatine. Des résultats similaires ont été obtenus à PPT intermédiaire (Figure III.11 B). Au contraire, à PPT tardif (Figure III.11 C), l'abondance relative de PARP clivée en normoxie devient plus élevée dans les cellules shARN 22 que dans les cellules shARN CTL. La tendance en hypoxie quant à elle reste similaire aux autres PPT et montre bien un niveau d'abondance de PARP clivée moins élevé qu'en normoxie.

En ce qui concerne la caspase 3, des bandes à très faible signal ou aucune bande sur la membrane correspondant à son poids moléculaire n'ont été détectées. Il est donc difficile d'interpréter ces résultats pour chaque réplicat aux différents PPT.

Pris ensemble, ces résultats indiquent un effet net de l'invalidation de TMEM45A dans les cellules RCC4 plus pVHL sur la sensibilité au cisplatine, avec l'observation d'une chimiorésistance des cellules shARN 22 en comparaison avec les cellules contrôles. De plus, ils témoignent de la protection conférée par l'hypoxie aux cellules cancéreuses face à cet agent chimiothérapeutique.

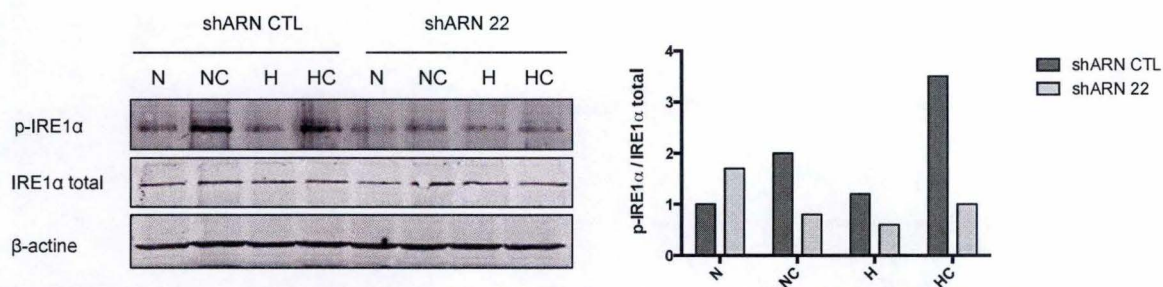
### **2.4 Identification de mécanismes potentiels impliquant TMEM45A dans la réponse des cellules RCC4 plus pVHL au cisplatine**

La partie suivante du mémoire consistait à investiguer un mécanisme potentiel permettant d'expliquer la chimiorésistance des cellules RCC4 plus pVHL shARN 22 comparées aux cellules transduites avec le shARN CTL. Dans le cadre d'une étude parallèle sur l'implication de TMEM45A dans la chimiosensibilité des cellules SQD9 provenant d'un cancer tête et cou, une expérience de RNA-sequencing (RNA-seq, technique de séquençage à haut-débit permettant d'identifier et de quantifier le transcriptome à un moment donné) a été réalisée. Ces analyses ont permis de mettre en évidence une cinquantaine de voies de signalisation dérégulées dans les cellules SQD9 invalidées par rapport aux cellules contrôles lors d'incubation en normoxie et en absence ou en présence de cisplatine (Figure III.12).

Un intérêt particulier s'est porté sur la voie UPR. Pour rappel, l'UPR est une association de voies de signalisation qui collaborent pour maintenir un environnement productif de repliement de protéines au niveau du RE. L'activation de la voie UPR est observée dans les cellules cancéreuses suite à un événement stressant pour le RE, tel qu'un traitement par un agent chimiothérapeutique (Wang and Kaufman, 2014). De plus, le RE est un organe proche et en relation avec l'appareil de Golgi, où se situe la protéine TMEM45A.

Pour investiguer la voie UPR, différents marqueurs peuvent être étudiés mais la phosphorylation d'IRE1 $\alpha$ , une branche de signalisation activée dans la voie UPR, a été choisie car elle a été mise en évidence auparavant dans les SQD9 incubées en présence de cisplatine (K. Schmit, résultats non publiés). Pour ce faire, l'abondance relative d'IRE1 $\alpha$

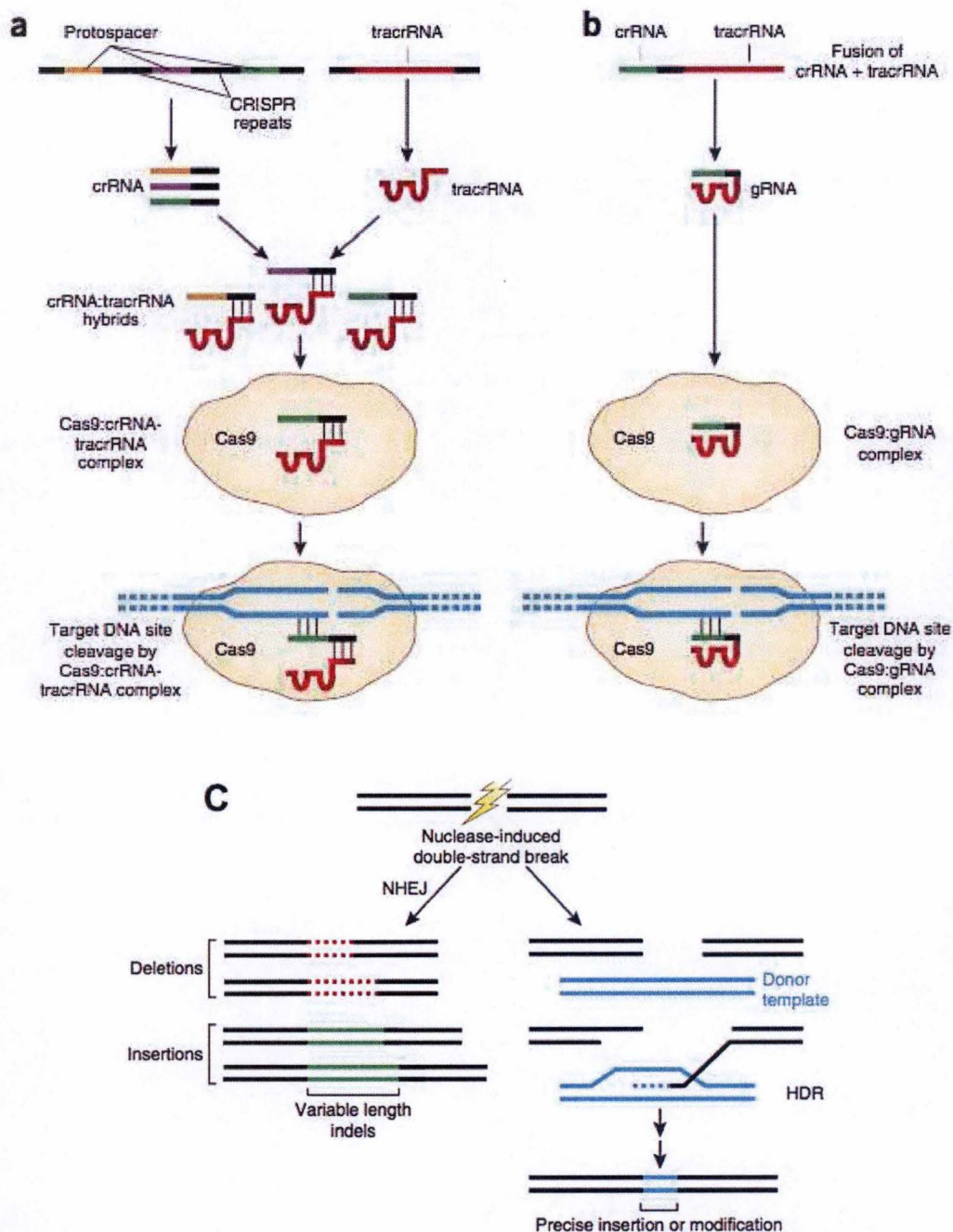




**Figure III.13 : Analyse de l'activation de la voie UPR dans les cellules RCC4 plus pVHL.**

Les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) ont été incubées en normoxie (N) ou hypoxie (H) pendant 48 heures avec ou sans cisplatine à 20  $\mu$ M. La lyse cellulaire pour l'extraction totale de protéines a été réalisée sur des cellules à passages post-transduction précoce. Les abondances relatives de IRE1α phosphorylée (p- IRE1α) et de IRE1α total ont été analysées par western blot avec la β-actine comme témoin de charge. Les résultats sont exprimés par le rapport entre l'abondance relative IRE1α phosphorylée et l'abondance relative de IRE1α total, puis normalisés par rapport à la condition de référence (shARN CTL, N).





**Figure III.14 : Principe du « genome editing » par la technique CRISPR-Cas9.**

(a) Chez certaines bactéries, les systèmes CRISPR (clustered regular interspaced short palindromic repeats) incorporent des séquences d'ADN étrangères dans des matrices CRISPR, qui produisent ensuite des ARNcr portant des régions «protospacer» complémentaires à l'ADN étranger. Les ARNcr s'hybrident aux ARNtracr (également codés par le système CRISPR) pour ensuite s'associer à la nucléase Cas9. Le complexe reconnaît et clive les ADN étrangers portant les séquences « protospacer ».

(b) Le système CRISPR-Cas le plus largement utilisé emploie une fusion entre un ARNc et une partie de la séquence ARNtracr pour donner un ARNg. Cet ARNg forme un complexe avec la Cas9 pour induire le clivage des sites d'ADN cibles qui sont complémentaires des 20 nucléotides de l'ARNg et qui se trouvent du côté 5' d'une séquence PAM.

(c) Les cassures double brin induites par la nucléase peuvent être réparées par la voie de réparation non homologue de terminaisons jointives (NHEJ) ou par la recombinaison homologue (HR). Une réparation imprécise par NHEJ peut produire des mutations d'insertion et/ou de délétion de longueur variable sur le site du DSB. Une réparation par HR peut introduire des mutations ponctuelles ou des insertions, à partir d'une matrice de donneur d'ADN simple brin ou double brin (Sander and Joung, 2014).



phosphorylée, a été analysée par western blot dans les cellules RCC4 plus pVHL shARN CTL et shARN 22 à PPT précoce, après incubation en normoxie ou en hypoxie et avec ou sans cisplatine à 20  $\mu$ M (Figure III.13). Les résultats montrent une augmentation du taux de phosphorylation d'IRE1 $\alpha$  dans les cellules incubées avec du cisplatine comparées aux cellules incubées sans cisplatine. Toutefois, cette augmentation d'abondance d'IRE1 $\alpha$  phosphorylée semble être moins importante dans les cellules invalidées pour *TMEM45A* que dans les cellules contrôles. Aucune différence marquée d'activation de la voie IRE1 $\alpha$  n'a été observée en hypoxie par rapport à la normoxie.

Pour conclure, ces résultats indiquent qu'un traitement au cisplatine induit un stress du RE et une activation de l'UPR par la voie IRE1 $\alpha$ . Cette activation semble cependant plus faible dans les cellules shARN 22, indiquant peut être une activation différentielle de l'UPR suite à l'invalidation de *TMEM45A*.

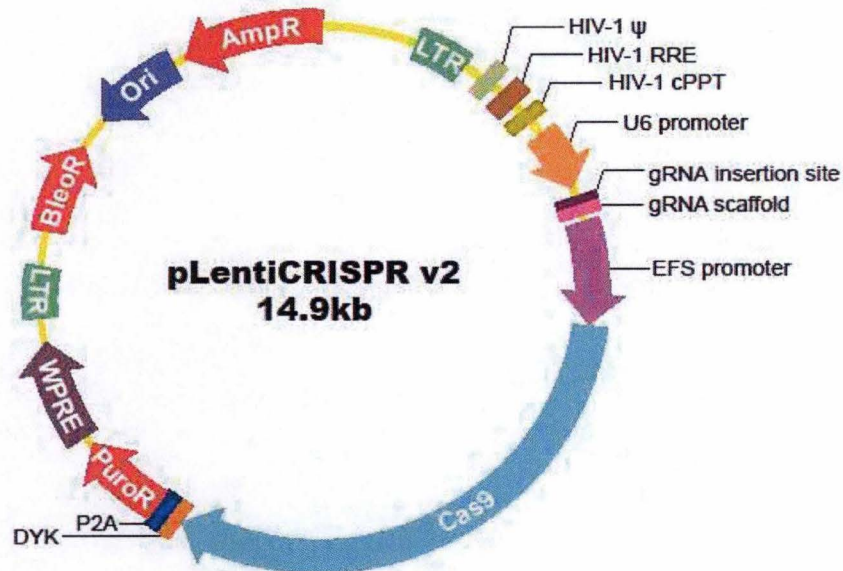
### 3 Invalidation de TMEM45A par le système de CRISPR-Cas9

Pour palier la perte d'invalidation de *TMEM45A* au fil des PPT dans les cellules transduites avec le shARN ciblant l'ARNm codant pour la protéine TMEM45A, une autre technique d'invalidation a été mise au point sur les cellules RCC4 plus pVHL dans la deuxième partie de ce mémoire.

Le système CRISPR-Cas9 (clustered regular interspaced short palindromic repeats – CRISPR associated protein 9) est une technologie révolutionnaire développée en 2013, dérivée du système immunitaire microbien. De nombreuses bactéries utilisent ce système pour se protéger des acides nucléiques étrangers, tels que ceux provenant des virus, ou des plasmides. Le système CRISPR de type II incorpore des séquences d'ADN étranger entre les séquences répétées CRISPR au sein du génome de la bactérie hôte. Les transcrits issus des séquences répétées CRISPR produisent des ARNcr (ARN CRISPR) portant des régions « protospacers » complémentaires aux séquences d'ADN étranger. Chaque ARNcr s'hybride avec un second ARN, connu sous le nom de ARNtracr (ARN CRISPR transactivateur), pour ensuite former un complexe avec la nucléase Cas9. La Cas9 est guidée par le protospacer de l'ARNcr pour cliver des séquences d'ADN cibles complémentaires, à condition qu'elles soient adjacentes à de courtes séquences connues sous le nom de PAM (protospacer adjacent motif) (Sander and Joung, 2014) (Figure III.14 A).

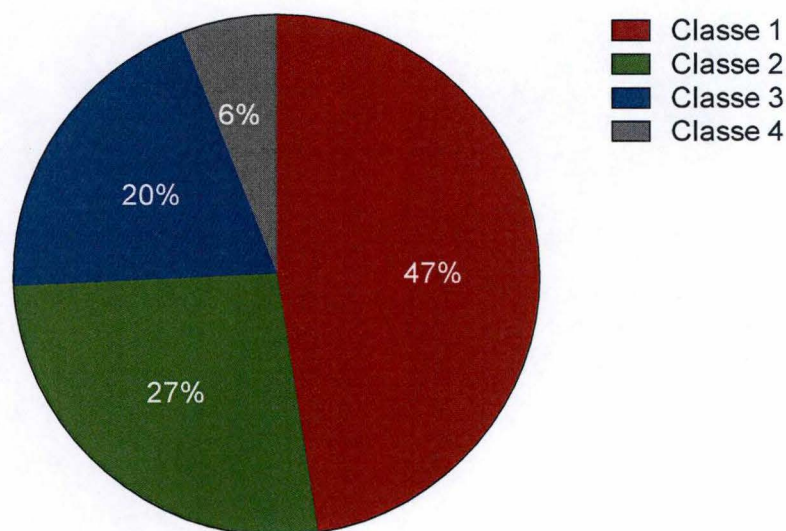
Le système CRISPR de type II de *S. pyogenes* a été adapté pour induire des cassures double brin spécifiques à une séquence et ainsi provoquer des modifications ciblées dans le génome. Dans la forme la plus simple et la plus largement utilisée de ce système, deux composants doivent être introduits et/ou être exprimés dans les cellules ou l'organisme cible : la nucléase Cas9 et un ARNg (ARN guide), qui consiste en une fusion d'un ARNcr et d'un ARNtracr. 20 nucléotides à l'extrémité 5' de l'ARNg (correspondant à la partie protospacer de l'ARNcr) dirigent la Cas9 à un site spécifique de l'ADN cible complémentaire, qui doit lui aussi être adjacent à une séquence PAM. Ainsi, avec ce système, l'activité de la nucléase Cas9 peut être dirigée vers n'importe quelle séquence d'ADN, simplement en modifiant les 20 premiers nucléotides de l'ARNg (Figure III.14 B). Suite au clivage par la Cas9, les cassures double brin peuvent être réparées par deux mécanismes de réparation : la HR (homologous repair) ou la NHEJ (non homologous end joining repair). La réparation médiée par HR peut être utilisée pour introduire des mutations ponctuelles spécifiques ou pour insérer des séquences désirées par recombinaison du locus cible avec des modèles donneurs d'ADN fournis de manière exogène. La réparation NHEJ peut conduire à l'introduction efficace de mutations





**Figure III.15 : Invalidation de l'expression de TMEM45A en utilisant le système CRISPR-Cas9 dans les cellules RCC4 plus pVHL.**

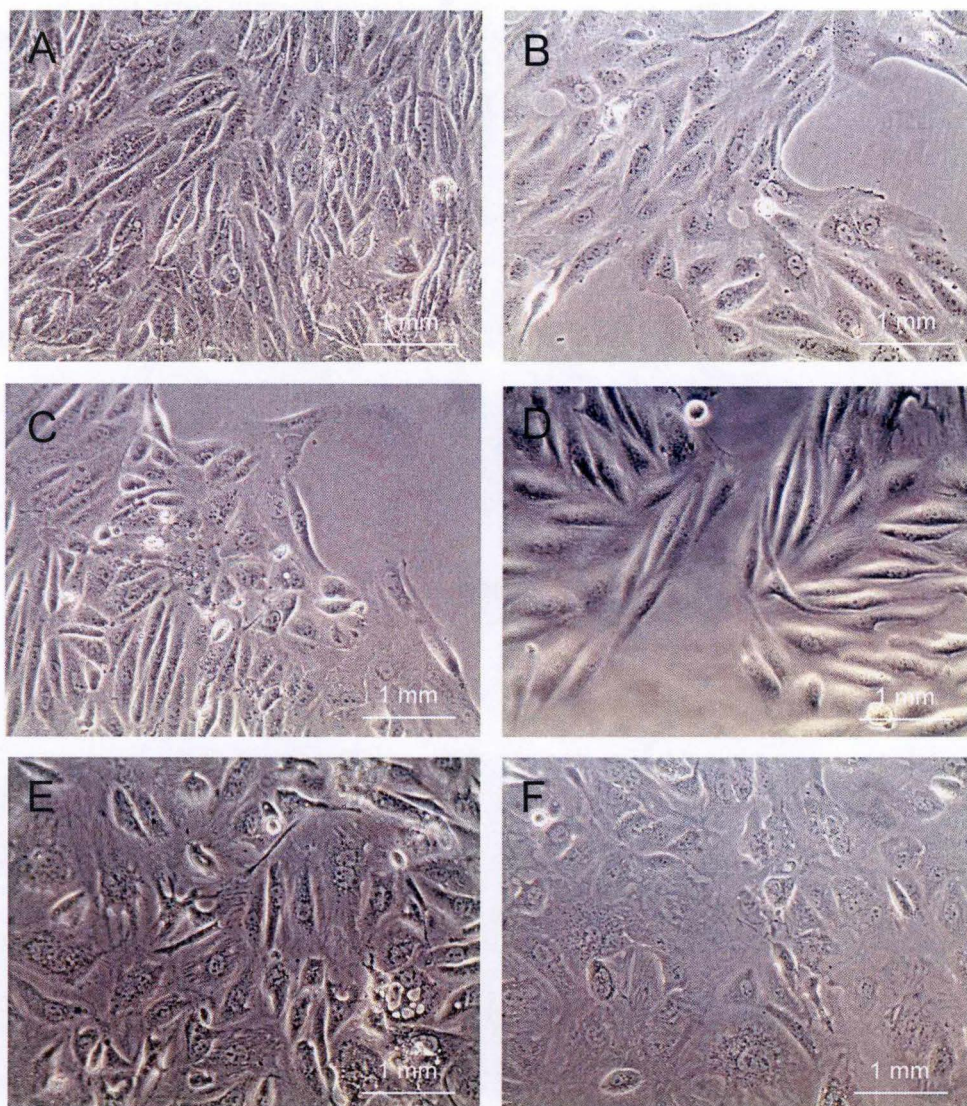
Les cellules ont été transduites avec des particules lentivirales conçues pour exprimer la nucléase Cas9 et un ARNg spécifique ciblant TMEM45A, grâce au plasmide pLenti CRISPR v2.



**Figure III.16 : Classification des clones des cellules RCC4 plus pVHL générés par le système CRISPR-Cas9.**

Les cellules ont été classées en quatre groupes distincts en fonction de leur taux de prolifération. Les clones de la classe 1 prolifèrent le plus rapidement et ceux de la classe 4 ne prolifèrent presque pas.





**Figure III.17 : Analyse de la morphologie des clones des cellules RCC4 plus pVHL générés par le système CRISPR-Cas9.**

Comparaison morphologique des clones générés par le système CRISPR-Cas9 de classe 1 (A), classe 2 (B), classe 3 (C) et classe 4 (D). Dans toutes les classes, certains clones adoptent une morphologie particulière (E et F). Les images sont prises au microscope à contraste de phase avec des grossissements de x10 et x200.



d'insertion/délétion (appelés indels) de différentes longueurs, qui peuvent perturber le cadre de lecture traductionnel d'une séquence codante (Sander and Joung, 2014) (Figure III.14 C). Cette technique permet donc une édition du génome simplement en induisant l'expression de la Cas9 et d'un ARNg complémentaire à une séquence d'ADN cible dans les cellules.

Le génome des cellules RCC4 plus pVHL a ainsi été ciblé par le système CRISPR-Cas9 afin d'inactiver *TMEM45A* et de mettre en évidence sa fonction dans les RCC. Les cellules ont été transduites avec des particules lentivirales conçues pour exprimer la nucléase Cas9 et un ARN guide spécifique ciblant *TMEM45A*, grâce au plasmide pLenti CRISPR v2 (Figure III.15). Pour cette étude, deux ARN guides ont été choisis : *TMEM45A-1* (GAAGTACATTGTTCCGAACA) et *TMEM45A-4* (TGACAACATTAACCTGGTTA), ciblant tous deux des séquences différentes du gène *TMEM45A*.

### 3.1 Analyse de la morphologie des clones CRISPR-Cas9

Suite à la transduction et à la sélection des cellules ayant bien intégré la séquence du vecteur leur permettant d'exprimer la Cas9 ainsi que l'ARNg ciblant une séquence spécifique de *TMEM45A*, les cellules RCC4 plus pVHL ont subi une dilution limite. Cette étape consiste à diluer une suspension cellulaire dans le but d'isoler une seule et unique cellule par puits pour qu'elle prolifère et engendre par la suite une population clonale. Ainsi, 280 clones ont été générés.

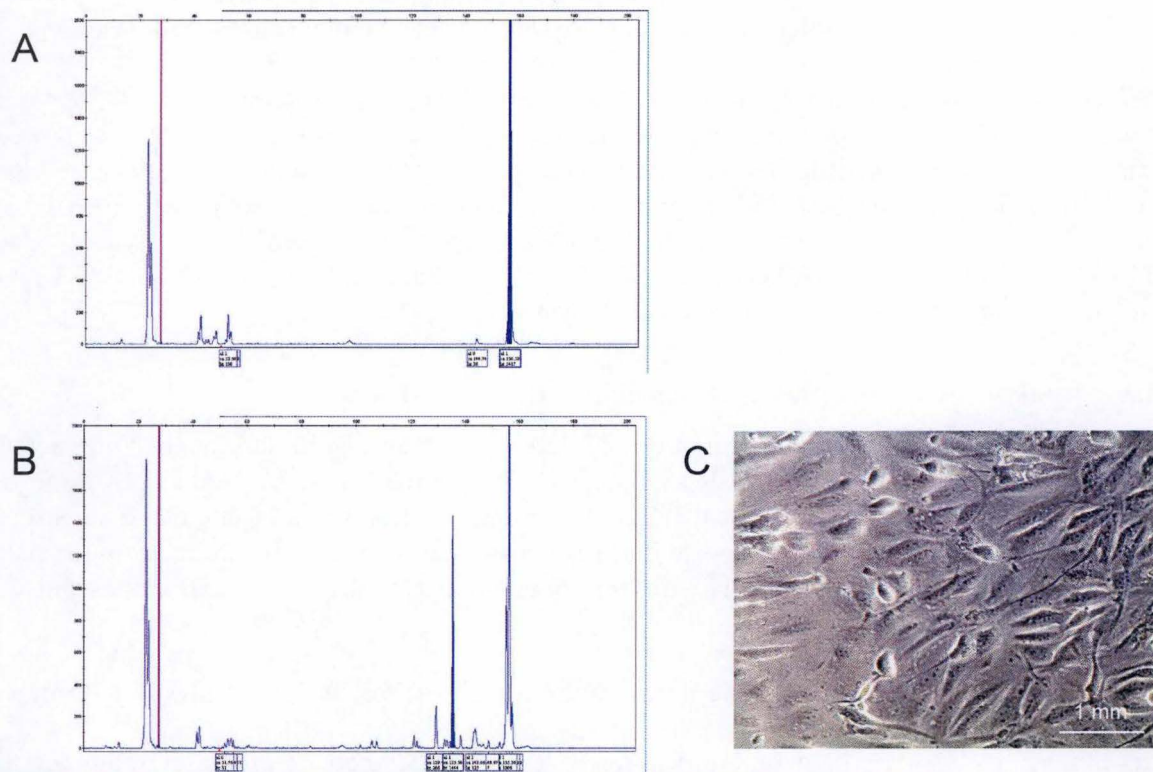
Parmi ces clones, une différence de prolifération a été observée et les cellules ont été de ce fait classées en quatre groupes.

Les clones de classe 1 sont ceux qui prolifèrent le plus rapidement et sont au nombre de 133 (49 provenant de l'ARNg *TMEM45-1* et 84 de *TMEM45A-4*), soit 47 % des clones totaux. Ceux de classe 2 prolifèrent de manière soutenue et ont été comptés au nombre de 75 (32 provenant de l'ARNg *TMEM45-1* et 43 de *TMEM45A-4*) soit 27 % du total. Les clones de classe 3 ont un taux de prolifération plus bas mais les cellules parviennent tout de même à se multiplier. 56 clones de cette classe ont été générés (27 provenant de l'ARNg *TMEM45-1* et 29 de *TMEM45A-4*). Les clones placés dans la classe 4 sont ceux ayant un très faible taux de prolifération et qui n'ont pas su passer au delà du stade en plaques 24 puits durant l'expansion clonale. Ils sont au nombre de 16 (6 provenant de l'ARNg *TMEM45-1* et 10 de *TMEM45A-4*) (Figure III.16). En guise de contrôle, des cellules non transduites (UT) ont également subi la dilution limite et l'expansion clonale. Une différence de prolifération a aussi été observée dans ces cellules, permettant leur classification en quatre groupes. Chacune de ces classes montraient des proportions de cellules UT similaires aux proportions retrouvées dans les cellules des cellules transduites.

D'un point de vue morphologique, aucune différence majeure n'a été remarquée entre les clones générés par CRISPR-Cas9 et les cellules invalidées pour *TMEM45A* par le shARN 22 (Figure III.17). Cependant, certains clones ont montré une morphologie particulière présentant des formes irrégulières avec un cytoplasme élargi (Figure III.17 E-F). Des morphologies particulières ont également été observées dans certaines cellules contrôles.

A ce stade de l'expérience, il était encore difficile de savoir si les différences de prolifération et de morphologie obtenus chez certains clones étaient dus à un stress induit par la dilution limite ou dus à une réelle invalidation de l'expression de *TMEM45A*.





**Figure III.18 : Analyse de l'invalidation de *TMEM45A* par le système CRISPR-Cas9.**

Plusieurs clones ont été sélectionnés pour déterminer la présence de mutations au sein du gène *TMEM45A* par l'utilisation de la technique d'analyse des fragments. Des cellules non transduites (UT) ont été utilisées comme contrôle, avec une séquence non mutée de *TMEM45A* correspondant à une taille de 156 pdb (A). Un clone obtenu muté hétérozygote pour *TMEM45A* montre un profil différent des cellules UT (B) sans altération particulière de la morphologie des cellules (C).

### 3.2 Analyse de l'invalidation de *TMEM45A* par le système CRISPR-Cas9

L'étape suivante était d'analyser si parmi les clones générés, certains étaient invalidés pour *TMEM45A*. Plusieurs clones ont été sélectionnés pour déterminer la présence de mutations au sein du gène *TMEM45A* par l'utilisation de la technique d'analyse des fragments. Cette technique permet de détecter des changements au niveau de la longueur d'une séquence d'ADN spécifique pour indiquer la présence ou l'absence d'indels. Bien que la séquence du gène ne soit pas directement analysée, la présence d'un allèle mutant peut être déduite par comparaison avec le gène sauvage des cellules UT. De plus, cette méthode permet de déterminer si la mutation s'est faite de manière homozygote (un pic) ou hétérozygote (2 pics ou plus). Pour ce faire, des amorces spécifiques des deux séquences cible des ARNg ont été conçues.

Dans les échantillons contrôles extraits des cellules UT, une seule taille de fragment correspondant à la séquence non mutée de *TMEM45A* par le système CRISPR-Cas9 était attendue. En effet, l'analyse de fragment a révélé la présence d'un seul pic correspondant au fragment de 156 pdb (Figure III.18 A).

Au vu des résultats obtenus montrant l'inhibition de la prolifération des cellules invalidées pour *TMEM45A* par le shARN 22 et les différents phénotypes de prolifération observés dans les clones CRISPR-Cas9, les clones de classes 3 et 4 dont le phénotype est le plus sévère ont été sélectionnés pour les premières analyses de fragments.

Parmi les premiers clones analysés, la majorité des échantillons a révélé un profil identique à celui des cellules contrôles, signifiant une absence de clivage de la séquence *TMEM45A* par le système CRISPR-Cas9. Cependant, pour l'un des clones, deux tailles de fragments différentes ont pu être observées, l'une de 135 pdb et l'autre de 156 pdb. Cela signifie que ce clone possède une délétion de 21 pdb sur un seul des allèles. Le système CRISPR-Cas9 a donc généré un clone hétérozygote muté pour *TMEM45A* (Figure III.18 B). Ce clone ne semble cependant pas avoir de morphologie particulière, malgré sa mutation pour *TMEM45A* (Figure III.18 C). Malheureusement, les analyses de fragments n'ont pour le moment pas encore révélé de clones homozygotes pour la mutation.

De façon générale, cette première partie de l'analyse de cette nouvelle méthode d'invalidation montre un faible nombre de mutants générés. L'analyse de fragment permet de conclure que les phénotypes prolifératifs et les morphologies particuliers observés dans certains clones ne semblent pas être liés à une mutation de *TMEM45A*.



## IV. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION



## Discussion et perspectives

L'hypoxie tumorale est largement reconnue comme étant une des causes d'échec thérapeutique et de mauvais pronostic pour les patients. Cela est principalement dû à la résistance qu'elle confère aux cellules cancéreuses face aux médicaments chimiothérapeutiques. Ce microenvironnement induit des modifications dans l'expression d'un large panel de gènes, initiées en grande partie par l'activation de HIF-1. Les stratégies ciblant HIF-1 et ses cibles peuvent dès lors représenter des voies potentielles de traitement des tumeurs hypoxiques (Cosse and Michiels, 2008; Ruan et al., 2009). Malheureusement, certains cancers tels que le RCC développent une résistance aux traitements standards comme ceux ciblant le VEGF et mTOR, qui font partie du réseau de HIF-1 (Rini and Atkins, 2009). Les mécanismes moléculaires responsables de l'adaptation des cellules cancéreuses aux conditions hypoxiques ne sont pas encore clairs. Cependant, dans une étude antérieure visant à élucider cette question, une analyse de l'expression du génome entier a permis de mettre en évidence les gènes dont l'expression corrélait le mieux avec la résistance aux médicaments dans des conditions d'hypoxie (Flamant et al., 2012). Parmi les gènes de cette liste se trouvait *TMEM45A*, un gène cible de HIF-1 codant pour une protéine aux fonctions inconnues. Depuis lors, il a été montré que cette protéine est également associée à la progression du RCC (Benita et al., 2009; Thibodeau et al., 2016).

Pour ce mémoire, la lignée cellulaire RCC4 plus pVHL a été choisie pour étudier le rôle de *TMEM45A* dans la protection conférée par l'hypoxie contre l'effet de la chimiothérapie anticancéreuse dans le RCC. Pour ce faire, son expression a été invalidée en utilisant un shARN exprimé de manière stable suite à la transduction lentivirale des cellules RCC4 plus pVHL.

Le premier objectif de l'étude était d'évaluer l'efficacité de l'invalidation de *TMEM45A*. Les abondances relatives d'ARNm et de protéines ont été évaluées dans les cellules RCC4 plus pVHL par RT-qPCR et par marquage par immunofluorescence respectivement. Les résultats ont indiqué une invalidation efficace mais non totale de *TMEM45A* dans les cellules transduites exprimant le shARN 22. A PPT précoce, les taux résiduels d'ARNm et de protéine *TMEM45A* dans ces cellules en hypoxie pourraient s'expliquer par l'augmentation importante de l'expression de *TMEM45A* dans cette condition, alors que son expression dans les cellules shARN 22 n'est pas supposée changer en fonction du taux d'oxygène. Cela entraîne probablement la saturation du pool de shARN 22 et donc une invalidation incomplète de *TMEM45A* dans ces cellules. Cependant, le fait que les niveaux d'ARNm et protéique de *TMEM45A* aient été encore plus élevés à PPT plus tardifs montrent l'existence d'une hétérogénéité au sein de la population des cellules shARN 22 qui a augmenté au fil des PPT. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. La première hypothèse est que le vecteur plasmidique contenant le gène codant pour le shARN 22 ne s'est pas bien intégré dans le génome de la cellule et ne s'est donc pas transmis dans les générations. Cette hypothèse a été exclue car les cellules ont été régulièrement sélectionnées à la puromycine et seules les cellules ayant incorporé le plasmide sont résistantes à cet agent de sélection. Deuxièmement, l'invalidation incomplète de *TMEM45A* peut être due à une mauvaise optimisation du protocole de transduction. Les cellules ont été transduites avec des particules lentivirales du VIH à une multiplicité d'infection (MOI) de 5 qui peut ne pas être suffisamment élevée pour inhiber fortement l'expression de l'ARNm et l'expression protéique de *TMEM45A* à long terme. En effet, bien que le VIH semble favoriser l'intégration au sein d'unités de transcription



actives, l'intégration de l'ADN lentiviral dans l'ADN de la cellule hôte n'est pas étroitement liée à la séquence et l'infection cellulaire est aléatoire (Schröder et al., 2002). Certaines cellules peuvent donc avoir incorporé plus de plasmides que d'autres et afficher une invalidation efficace de *TMEM45A* tandis que celles qui ont seulement incorporé un plasmide ne présentent pas ce phénotype. Une transduction avec une MOI plus élevée pourrait ainsi augmenter la possibilité d'intégration multiple du plasmide et forcer le phénotype désiré. Une autre hypothèse possible pourrait s'expliquer par un phénomène épigénétique survenant dans les cellules. Le vecteur plasmidique utilisé dans les particules pseudovirales pour la transduction est composé de deux promoteurs : le promoteur U6 et le promoteur de la phosphoglycérate kinase humaine (hPGK), qui entraînent respectivement l'expression du shARN 22 et du gène de résistance à la puromycine. Chacun des deux promoteurs est reconnu par une ARN polymérase différente. L'ARN polymérase II se lie au promoteur hPGK tandis que U6 est reconnu par l'ARN polymérase III (Lebbink et al., 2011; Lobo and Hernandez, 1989). Le problème ne provient donc pas d'un effet compétitif entre les deux promoteurs pour la même ARN polymérase. Bien que hPGK soit listé comme un promoteur faible, une étude a montré la forte susceptibilité des promoteurs U6 à être méthylés par des méthyltransférases d'ADN en raison de leur plus grande densité en CpG, entraînant un empêchement de transcription de U6 par l'ARN polymérase III (Selvakumar et al., 2012). Ce phénomène ne s'applique toutefois pas au promoteur hPGK. L'expression du shARN 22 serait donc réprimée alors que les cellules seraient encore résistantes à la puromycine. Une dernière possibilité est que, par leur capacité à s'adapter à de nombreuses conditions, les cellules cancéreuses RCC4 plus pVHL ont subi une altération qui leur permet de compenser la perte de *TMEM45A*. La question persistante demeure comment et pourquoi les cellules s'adaptent à cette perte, considérant que la fonction de *TMEM45A* n'est pas encore claire.

Malgré ces observations, nos résultats ont mis en évidence la surexpression de *TMEM45A* dans des conditions hypoxiques par rapport à une faible expression basale dans des conditions de normoxie. Les données ont également confirmé la localisation des protéines autour du noyau et son association avec l'appareil de Golgi comme démontré dans des études antérieures (Hayez et al., 2014, 2016). L'appareil de Golgi a pour fonction principale de servir de transit et de réservoir entre le RE et la membrane plasmique, mais cet organite constitue également un lieu essentiel pour la sélection et le tri de protéines de la voie sécrétoire vers les différents organites. L'appareil de Golgi permet notamment la maturation des protéines et des lipides par ajout de modifications post-traductionnelles, telles que des glycosylations ou des sulfatations. De par sa localisation dans la membrane de cet organite, il est possible d'émettre quelques hypothèses sur la fonction de *TMEM45A*. Les protéines résidentes du Golgi sont soit transmembranaires, soit des protéines périphériques situées sur la face cytoplasmique de la membrane du Golgi. Ces protéines jouent un rôle majeur dans les fonctions principales du Golgi telles que la maturation et le transport des protéines et des lipides. Il serait donc possible que *TMEM45A* ait un rôle similaire à ces protéines.

L'étape suivante consistait à comparer le phénotype des cellules transduites avec le shARN 22 par rapport à celui des cellules transduites avec le shARN CTL. Aucune différence au niveau morphologique n'a été observée mais les résultats des tests MTT et des comptages cellulaires ont montré une différence de taux de prolifération entre les deux lignées cellulaires, suggérant un effet possible de l'inactivation *TMEM45A* sur la prolifération cellulaire et le cycle cellulaire. Un tel effet a déjà été observé dans d'autres études sur les cellules cancéreuses de l'ovaire et les cellules de gliome (Guo et al., 2015b; Sun et al., 2015). Cependant, dans nos résultats, cet effet de *TMEM45A* sur la prolifération cellulaire était de moins en moins marqué



au fil des passages, comme le montre la perte de l'inhibition de la prolifération dans les cellules shARN 22 à PPT plus tardif. La perte de ce phénotype correspond à la perte partielle et progressive de l'invalidation observée à PPT tardif. Cette observation suggère un rôle de TMEM45A dans la régulation de la prolifération cellulaire. Afin d'apporter une précision à ces données, une analyse en cytométrie de flux visant à étudier la progression du cycle cellulaire a été effectuée sur les cellules shARN CTL et shARN 22 à PPT précoce. Une différence au niveau de la répartition des deux populations au sein des différentes phases du cycle cellulaire a été observée. Les cellules invalidées pour *TMEM45A* présentaient un cycle cellulaire ralenti et une accumulation en phase S, comparées aux cellules contrôles. Il est donc probable que la différence de prolifération entre ces deux lignées soit due à une progression plus lente des cellules shARN 22 dans le cycle cellulaire comparées aux cellules contrôles.

La suite de ce travail s'est portée sur l'objectif principal de ce mémoire, qui est d'étudier le rôle de TMEM45A dans la protection conférée par l'hypoxie contre les agents chimiothérapeutiques dans le RCC. Cette protéine s'est révélée être un acteur important dans la chimiorésistance face aux drogues dans les cellules du cancer du sein et du foie (Flamant et al., 2012), mais également dans le cancer tête et cou (K. Schmit, données non publiées). Dans le but d'étudier ce rôle de la protéine dans le RCC, la sensibilité au cisplatine des cellules RCC4 plus pVHL a été étudiée par des tests MTT, des tests de relargage de LDH et des analyses de western blot. Pris ensemble, les résultats obtenus pour ces différentes expériences à divers PPT sont cohérents. D'une manière surprenante, les cellules exprimant le shARN 22 se sont révélées plus résistantes au cisplatine que les cellules shARN CTL à PPT précoce autant en conditions de normoxie que d'hypoxie. De plus, les tests de dosage de la LDH et les analyses par western blot ont permis de mettre en évidence la protection conférée par l'hypoxie face au cisplatine des cellules du cancer rénal. L'implication de TMEM45A en tant que seul acteur de ce mécanisme n'a toutefois pas pu être prouvée, étant donné que son invalidation a montré des effets similaires en normoxie. Le rôle de cette protéine peut dès lors s'étendre au delà des conditions d'hypoxie malgré sa faible expression en normoxie.

En outre, suite à ces résultats, une corrélation entre l'impact du cisplatine et la progression des cellules RCC4 plus pVHL dans le cycle cellulaire peut être établie. Bien que le cisplatine ne dépende pas du cycle cellulaire pour induire des dommages à l'ADN, il a été reporté que les cellules en phase G1 étaient plus sensibles à cette drogue (Schwartz, 2005; Un, 2007). La chimiorésistance des cellules shARN 22 pourrait dès lors être expliquée par sa proportion de cellules moins importantes en phase G1 (environ 10 %) comparées à celle des cellules contrôles (plus de 30 %). Cependant, pour les cellules SQD9 provenant du cancer tête et cou, une accumulation en phase S des cellules invalidées pour *TMEM45A* a également été observée. La proportion de cellules en phase G1 était également moins importante pour les cellules shARN 22 que les shARN CTL (environ un tiers de la population) (K. Schmit, résultats non publiés). Contrairement aux RCC4 plus pVHL, les cellules SQD9 shARN 22 sont plus sensibles au cisplatine que les cellules contrôles (données non montrées). Il est néanmoins intéressant de noter que les cellules mutées pour p53, telles que les SQD9, seraient plus sensibles au cisplatine par la perte du contrôle du point de contrôle G1/S et une diminution de la réparation des adduits formés par le cisplatine (Pestell et al., 2000).

La différence de sensibilité au cisplatine suite à l'invalidation de *TMEM45A* entre les cellules SQD9 et les cellules RCC4 plus pVHL pourrait peut-être se trouver au niveau de l'efficacité et la rapidité des réparations des dommages à l'ADN. Pour les perspectives, il serait donc intéressant d'investiguer l'induction des dommages à l'ADN par le cisplatine, ainsi que le recrutement des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN. Cela



pourrait notamment se faire via une cinétique des marquages en immunofluorescence de  $\gamma$ H2AX, un marqueur de cassures double brin de l'ADN, et de Rad51, une recombinaise recrutée lors de la réparation de l'ADN.

Concernant les perspectives pour continuer à étudier l'apoptose induite par le cisplatine, des tests de mesure d'activité des caspase 3 et caspase 7 seraient envisageables. Ce test est basé sur le clivage d'une séquence identique aux substrats des caspases 3 et 7. Ce substrat synthétique est lié à un fluorochrome et génère une molécule fluorescente quantifiable lorsqu'il se fait cliver par les caspases. Ce test pourrait notamment remédier au problème rencontré lors d'essais de mise en évidence du clivage de la caspase 3 en western blot.

Un point important à résoudre était de savoir par quel mécanisme les RCC4 plus pVHL invalidées pour *TMEM45A* induisaient une chimiorésistance face au cisplatine par comparaison aux cellules contrôles. Des analyses préliminaires effectuées par RNA-seq dans une étude parallèle sur l'implication de *TMEM45A* dans la chimiosensibilité des cellules SQD9 ont permis de mettre en évidence une cinquantaine de voies de signalisation dérégulées. Parmi ces voies de signalisation se trouvent l'UPR, qui a été choisie pour être étudiée dans les cellules RCC4 plus pVHL. La voie UPR semblait être une piste intéressante d'une part par l'activation de cette voie en réponse à un stress induit au RE suite à un traitement par un agent chimiothérapeutique, et d'autre part par la localisation de *TMEM45A* au niveau de l'appareil de Golgi. Les western blots réalisés pour mettre en évidence l'activation de l'UPR par la voie IRE1- $\alpha$  ont montré une activation moindre de cette voie de signalisation, caractérisée par une diminution du taux de phosphorylation d'IRE1- $\alpha$ , dans les cellules RCC4 plus pVHL shARN 22 par rapport aux cellules contrôles. Contrairement aux cellules RCC4 plus pVHL, les cellules SQD9 shARN 22 se sont avérées avoir une activation plus importante de la voie IRE1- $\alpha$ , comparées aux cellules shARN CTL. Ceci est la première de nos expériences où les résultats montrent une tendance opposée dans l'expression de gènes ou l'activation de voies de signalisation entre les lignées cellulaires SQD9 et RCC4. Dans la littérature, il a été montré qu'une activation modérée de la voie UPR possède un rôle anti-apoptotique qui augmenterait la survie des cellules cancéreuses et conférerait une résistance aux drogues, tandis qu'une activation accrue de cette voie mènerait à l'apoptose (Li, 2013). Ce phénomène pourrait donc expliquer la chimiorésistance des cellules RCC4 plus pVHL invalidées pour *TMEM45A* comparées à leurs cellules contrôles, mais pourrait également justifier la différence de chimiosensibilité au cisplatine entre les cellules SQD9 et RCC4 plus pVHL. Suite à cela, il est possible d'émettre l'hypothèse d'un rôle dual de la protéine *TMEM45A* dans la sensibilité des cellules à un agent chimiothérapeutique. Ce rôle dual serait en relation avec l'activation différentielle de la voie UPR induite par un stress du RE, qui serait dépendant d'une lignée cellulaire à l'autre.

Des investigations approfondies dans le rôle de *TMEM45A* en lien avec la voie UPR seraient dès lors intéressantes à l'avenir. L'étude des deux autres voies de signalisation de l'UPR, que sont ATF6 et PERK, n'a malheureusement pas pu être mise en évidence dans ce travail faute de temps. Lors de l'activation de la voie de signalisation IRE1- $\alpha$  l'ARNm de XBP1 subit un épissage pour être activé et pour pouvoir être transloqué dans le noyau afin d'induire la transcription de gènes impliqués dans l'UPR (Tsai and Weissman, 2010). Cet épissage peut être détecté par PCR et migration des amplicons sur gel d'agarose.

D'autres voies de signalisation mises en évidence par le RNA-seq, qui sont dérégulées lors de l'invalidation de *TMEM45A* et du traitement au cisplatine, pourraient également être intéressantes à étudier.



Plusieurs voies impliquant le glutathion ont été mises en évidence dans l'analyse du RNA-seq. Le glutathion est un tripeptide ayant de multiples fonctions dans les organismes vivants. En tant que porteur d'un groupe thiol sous la forme d'un résidu de cystéine, il agit comme antioxydant soit directement en interagissant avec des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ou d'azote (RNS). De plus, les formes réduites et oxydées du glutathion (GSH et GSSG) agissent en association avec d'autres composés redox-actifs, le NADPH par exemple, pour réguler et maintenir l'état redox cellulaire. D'autres rôles lui sont également attribués, y compris la détoxification de nombreux composés endogènes et exogènes (Lushchak, 2012). En effet, le glutathion est capable de modifier la sensibilité des cellules au cisplatine ainsi que son action par régulation de son efflux et de son transport, et de ce fait, de diminuer sa capacité induire la cytotoxicité.

PTGS2 (prostaglandin-endoperoxide synthase), également appelée COX-2 (cyclooxygénase-2) constitue un autre acteur associé à de nombreuses voies de signalisation et qu'il serait intéressant d'étudier. Elle fait partie de la famille COX, qui sont des lipide peroxydases situées du côté lumenale du RE et de la membrane nucléaire. Ces enzymes catalysent l'étape limitante de la biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. COX-2 est habituellement absente dans les tissus mais son expression peut être induite par plusieurs stimuli physiologiques comme des facteurs de croissance et différentes cytokines, telles que IL-1 $\beta$ , IL-6 ou TNF $\alpha$ . Cette enzyme est surexprimée lors d'inflammation. De fait, le promoteur du gène *COX-2* présente un élément de réponse à NF $\kappa$ B ainsi que d'autres éléments de réponse dépendants des cytokines (Sobolewski et al., 2010; Williams et al., 2000). La surexpression de COX-2 a également été associée avec un certain nombre de cancers, tels que le cancer colorectal, le cancer du pancréas et du poumon, dans lesquels son expression est corrélée à un mauvais pronostic. Cette surexpression augmente la production de prostaglandines, connues pour favoriser la progression tumorale en modulant la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, l'angiogenèse et l'invasion, affectant aussi l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses (Sobolewski et al., 2010).

Enfin, RhoA, qui est un membre de la famille des petites GTPases Rho, a été mis en évidence dans l'analyse du RNA-seq. Les GTPases de la famille Rho sont principalement connues pour leurs contributions à la réorganisation du cytosquelette d'actine, mais aussi pour la régulation de la forme, l'adhérence et la motilité des cellules. Leur surexpression favorise plusieurs aspects de la progression tumorale, y compris la transformation cellulaire, la cytokinèse, l'angiogenèse, le dépôt de la matrice extracellulaire et la dissémination des cellules tumorales (O'Connor and Chen, 2013). De plus, RhoA est connue pour réguler la progression du cycle cellulaire au niveau de la phase G1, notamment par la régulation de l'expression de la cycline D1, de p21 et de p27. Dès lors, il serait intéressant d'investiguer si cette protéine contribue ou non à la diminution de la prolifération observée dans les cellules shARN 22 (Weber et al., 1997; Zuckerbraun et al., 2003).

Les analyses du RNA-seq ont également permis de mettre en évidence la dérégulation de 469 gènes due à l'inactivation de *TMEM45A* et au traitement avec du cisplatine. Parmi les 10 premiers de cette liste se trouvent les gènes *PolDIP2* et *UQCR10*. Ces deux gènes n'ont été que très peu, voir pas du tout associés à des voies de signalisation dans les programmes et bases de données d'analyse du RNA-seq. L'abondance relative d'ARNm de ces deux gènes a été analysée par RT-qPCR sur les cellules RCC4 plus pVHL shARN CTL et 22.

Pour *PolDIP2* qui code pour la protéine PolDIP2 (polymerase delta interacting protein 2), une diminution de l'expression de l'ARNm a été observée dans les cellules shARN 22 en comparaison aux cellules contrôles (Annexe 1). PolDIP2 est une protéine multifonctionnelle peu étudiée, décrite à l'origine comme un partenaire de liaison de la sous-unité p50 de l'ADN polymérase  $\delta$  et de la pince glissante PCNA (proliferating cell nuclear antigen) qui a pour rôle



d'augmenter la processivité de l'ADN polymérase  $\delta$  lors de la réplication. D'autres rôles, y compris la progression du cycle cellulaire par augmentation de l'expression de la cycline A, de la Cdk1 (cyclin dependent kinase 1) et de PCNA, ainsi que l'élongation mitochondriale et la production de ROS via Nox4 lui sont également attribués (Hernandes et al., 2017). De par les rôles de PolDIP2, la diminution d'expression de *PolDIP2* pourrait expliquer l'inhibition de la prolifération des cellules invalidées pour *TMEM45A* comparées aux cellules contrôles. Cette diminution entraînerait une réduction de l'expression de Cdk1, une protéine jouant un rôle majeur dans la progression et la régulation du cycle cellulaire. De plus, un lien entre PolDIP2 et l'accumulation en phase S des cellules shARN 22 comparées aux cellules contrôles peut être établi. Il est possible qu'une diminution d'expression de PolDIP2 induise un ralentissement de la processivité de l'ADN polymérase  $\delta$  lors de la réplication et ralentissent la progression des cellules shARN 22 dans la phase S.

En ce qui concerne *UQCR10* qui code pour la protéine UQCR10 (ubiquitinol-cytochrome c reductase 10), les résultats de RT-qPCR ont montré une augmentation du niveau d'abondance d'ARNm allant jusqu'à plus de 2 fois, dans les cellules invalidées pour *TMEM45A* par rapport aux cellules contrôles (Annexe 2). UQCR10 est une sous-unité du complexe III (encore appelé coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase ou complexe cytochrome bc1) de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le complexe III est un complexe multiprotéique lié à la membrane mitochondriale interne, qui catalyse le transfert d'électrons de l'ubiquinol au ferricytochrome-c. Cette réaction redox est associée à un transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial (Schägger et al., 1995). Bien que peu d'études soient effectuées à son sujet, une investigation de cette protéine pourrait être intéressante, notamment pour vérifier s'il existe une différence d'activité mitochondriale qui pourrait modifier le métabolisme des cellules invalidées pour *TMEM45A*.

Enfin, pour résoudre la perte d'invalidation de *TMEM45A* progressive au sein des cellules shARN 22 au fil des PPT, une autre technique d'invalidation a été mise au point sur les RCC4 plus pVHL dans la dernière partie de ce mémoire. *TMEM45A* a été invalidé par le système de CRISPR-Cas9 permettant d'exprimer la nucléase Cas-9 guidée par un ARNg pour cibler le clivage d'une séquence spécifique de *TMEM45A*. 280 clones ont été générés par cette technique. Ces clones montraient des variations aux niveaux prolifératif et morphologique mais les analyses de fragments ont démontré que ces phénotypes n'étaient pas forcément liés à une invalidation de *TMEM45A*. En effet, seulement un clone de classe 4, c'est-à-dire ne proliférant presque pas, s'est montré être hétérozygote pour *TMEM45A* muté. Ce clone ne semblait cependant pas présenter une morphologie particulière en comparaison avec les cellules UT. De plus, d'autres clones montrant un phénotype de prolifération plus sévère se sont finalement avérés contenir la séquence sauvage de *TMEM45A*.

Au vu des résultats obtenus à ce stade, nous nous rendons compte que l'invalidation du gène d'intérêt par le système CRISPR-Cas9 possède plusieurs limites. Premièrement, certaines étapes de ce protocole exercent un impact sur le phénotype des cellules. L'étape de la dilution limite a probablement modifié le phénotype et le comportement de certains clones qui pourraient être associés à tort à l'invalidation de *TMEM45A*. De plus, du fait que la Cas9 reste active au fil des générations cellulaires, il est possible que des sous-populations de clones surgissent au sein de la population monoclonale. Le clivage en continu par la Cas9 peut générer une variété de mutants qui peuvent surgir à différents moments de la procédure. Cela s'illustre par la présence de smear (plusieurs pics) plus ou moins importants, caractérisant l'existence d'une multitude d'indels de la séquence cible de *TMEM45A*.

Pour la suite de cette étude, il serait nécessaire de vérifier par analyse de fragments l'invalidation de gène *TMEM45A* dans les clones de classes 1 et 2. La sélection d'un clone



homozygote invalidé pour *TMEM45A* permettrait d'étudier la réelle fonction de TMEM45A dans le RCC. En réalisant les expériences déjà effectuées sur les cellules RCC4 plus pVHL invalidées avec le shARN22, il serait possible de savoir si les résultats obtenus au préalable correspondent ou non à aux résultats des cellules RCC4 plus pVHL invalidées par CRISPR-Cas9.

## Conclusion générale

A ce jour, peu d'informations concernant la fonction de TMEM45A sont connues. Son implication dans divers cancers a néanmoins été démontrée à plusieurs reprises (Flamant et al., 2012; Guo et al., 2015b; Lee et al., 2012; Sun et al., 2015). Bien qu'une corrélation entre l'agressivité des RCC et TMEM45A ait déjà été rapportée (Thibodeau et al., 2016), cette étude montre pour la première fois l'implication de cette protéine dans la chimiosensibilité des cellules du cancer rénal. Outre l'effet chimiorésistant qu'il confère aux cellules cancéreuses dans divers cancers, TMEM45A semble plutôt être chimiosensibilisant dans les cellules RCC4 plus pVHL, suggérant son rôle dual dans la chimiosensibilité des cellules cancéreuses face aux agents chimiothérapeutiques, qui serait dépendant du type de cellules cancéreuses. De plus, cette fonction ne serait pas limitée qu'à des conditions d'hypoxie étant donné que son rôle potentiel en normoxie a également été mis en avant. Le mécanisme par lequel cette protéine agirait n'est pas encore clair mais elle semble exercer sa fonction en association avec la voie UPR. De par sa localisation et sa relation avec la voie UPR, il serait dès lors possible que TMEM45A possède un rôle physiologique dans la maturation et le transport de protéines.



## V. BIBLIOGRAPHIE



- Ahmed, M., and Rahman, N. (2006). ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene* 25, 5906–5911.
- Van Amerongen, R., and Berns, A. (2006). TXR1-mediated thrombospondin repression: A novel mechanism of resistance to taxanes? *Genes Dev.* 20, 1975–1981.
- Apparailly, F., and Jorgensen, C. (2013). SiRNA-based therapeutic approaches for rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9, 56–62.
- Arora, A., and Scholar, E.M. (2005). Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 971–979.
- Banks, R.E., Tirukonda, P., Taylor, C., Hornigold, N., Astuti, D., Cohen, D., Maher, E.R., Stanley, A.J., Harnden, P., Joyce, A., et al. (2006). Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res.* 66, 2000–2011.
- Benita, Y., Kikuchi, H., Smith, A.D., Zhang, M.Q., Chung, D.C., and Xavier, R.J. (2009). An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 37, 4587–4602.
- Bindra, R.S., Crosby, M.E., and Glazer, P.M. (2007). Regulation of DNA repair in hypoxic cancer cells. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 249–260.
- Bouwman, P., and Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer* 12, 587–598.
- Brodaczewska, K.K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., and Czarnecka, A.M. (2016). Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol. Cancer* 15, 83.
- Brugarolas, J. (2013). PBRM1 and BAP1 as Novel Targets for Renal Cell Carcinoma. *Cancer J.* 19, 324–332.
- Cairns, P. (2010). Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark.* 9, 461–473.
- Capitanio, U., and Montorsi, F. (2016). Renal cancer. In *The Lancet*, pp. 894–906.
- Chabner, B. a, and Roberts, T.G. (2005). Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 65–72.
- Cheng, L., Zhang, S., MacLennan, G.T., Lopez-Beltran, A., and Montironi, R. (2009). Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum. Pathol.* 40, 10–29.
- Chow, W.-H., Dong, L.M., and Devesa, S.S. (2010). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 7, 245–257.
- Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, N.A., Montalto, M.C., and Colgan, S.P. (2002). Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* 62, 3387–3394.
- Cosse, J.-P., and Michiels, C. (2008). Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 8, 790–797.
- Coustan-Smith, E., Kitanaka, A., Pui, C.H., McNinch, L., Evans, W.E., Raimondi, S.C., Behm, F.G., Aricò, M., and Campana, D. (1996). Clinical relevance of BCL-2 overexpression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 87, 1140–1146.
- Creighton, C., Morgan, M., Gunaratne, P., Wheeler, D., Gibbs, R., Gordon Robertson, a, Chu, A.A., Beroukhim, R., Cibulskis, K., Signoretti, S., et al. (2013). Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 499, 43–49.
- Dasari, S., and Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 364–378.
- deGraffenried, L.A., Fulcher, L., Friedrichs, W.E., Grünwald, V., Ray, R.B., and Hidalgo, M. (2004). Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to



- inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Ann. Oncol.* **15**, 1510–1516.
- DeVita, V.T., and Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **68**, 8643–8653.
- Dominguez-Brauer, C., Thu, K.L., Mason, J.M., Blaser, H., Bray, M.R., and Mak, T.W. (2015). Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol. Cell* **60**, 524–536.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15665–15670.
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Díaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA - Repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst.)* **3**, 1389–1407.
- Flamant, L., Roegiers, E., Pierre, M., Hayez, A., Sterpin, C., De Backer, O., Arnould, T., Poumay, Y., and Michiels, C. (2012). TMEM45A is essential for hypoxia-induced chemoresistance in breast and liver cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 391.
- Fresno Vara, J. a, Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* **30**, 193–204.
- Fu, D., Calvo, J.A., and Samson, L.D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat. Rev. Cancer.*
- Georgina N. Masoud, W.L. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 378–389.
- Gocheva, V., Wang, H.W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T., and Joyce, J.A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* **24**, 241–255.
- Gottesman, M.M. (2002). Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**, 615–627.
- Gozuacik, D., and Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891–2906.
- Guerrero-Zotano, A., Mayer, I.A., and Arteaga, C.L. (2016). PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 515–524.
- Guinan, P., Vogelzang, N.J., Randazzo, R., Sener, S., Chmiel, J., Fremgen, A., Sylvester, J., and Cancer, I. and E.R.C. (1992). Renal pelvic cancer: A review of 611 patients treated in Illinois 1975-1985. *Urology* **40**, 393–399.
- Guo, H., German, P., Bai, S., Barnes, S., Guo, W., Qi, X., Lou, H., Liang, J., Jonasch, E., Mills, G.B., et al. (2015a). The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J. Genet. Genomics* **42**, 343–353.
- Guo, J., Chen, L., Luo, N., Yang, W., Qu, X., and Cheng, Z. (2015b). Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells. *Oncol. Rep.* **33**, 3124–3130.
- Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. (2011). Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70.
- Harada, H., Itasaka, S., Zhu, Y., Zeng, L., Xie, X., Morinibu, A., Shinomiya, K., and Hiraoka, M. (2009). Treatment regimen determines whether an HIF-1 inhibitor enhances or inhibits the effect of radiation therapy. *Br. J. Cancer* **100**, 747–757.
- Harris, A.L. (2002). HYPOXIA — A KEY REGULATORY FACTOR IN TUMOUR



- GROWTH. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47.
- Harten, S.K., Esteban, M.A., Shukla, D., Ashcroft, M., and Maxwell, P.H. (2011). Inactivation of the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene induces Neuromedin U expression in renal cancer cells. *Mol. Cancer* 10, 89.
- Hayez, A., Malaisse, J., Roegiers, E., Reynier, M., Renard, C., Haftek, M., Geenen, V., Serre, G., Simon, M., de Rouvroit, C.L., et al. (2014). High TMEM45A expression is correlated to epidermal keratinization. *Exp. Dermatol.* 23, 339–344.
- Hayez, A., Roegiers, E., Malaisse, J., Balau, B., Sterpin, C., Achouri, Y., De Rouvroit, C.L., Poumay, Y., Michiels, C., and De Backer, O. (2016). TMEM45A is dispensable for epidermal morphogenesis, keratinization and barrier formation. *PLoS One* 11.
- Hernandes, M.S., Lassègue, B., and Griendling, K.K. (2017). Polymerase  $\delta$ -interacting Protein 2 : A Multifunctional Protein. *J Cardiovasc Pharmacol* 69, 335–342.
- Hockel, M., and Vaupel, P. (2001). Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 93, 266–276.
- Holmes, D. (2011). PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 563–564.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 13, 714–726.
- Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: An overview. *Cancers (Basel)*. 6, 1769–1792.
- Hsieh, J.J., Purdue, M.P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., Heng, D.Y., Larkin, J., and Ficarra, V. (2017). Renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3, 17009.
- Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). DEATH AND ANTI-DEATH: TUMOUR RESISTANCE TO APOPTOSIS. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277–288.
- Ichim, G., and Tait, S.W.G. (2016). A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* 16, 539–548.
- Jeggo, P.A., Pearl, L.H., and Carr, A.M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: A historical perspective. *Nat. Rev. Cancer* 16, 35–42.
- Junttila, M.R., and de Sauvage, F.J. (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501, 346–354.
- Kaelin Jr, W.G. (2008). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8, 865–873.
- Kapitsinou, P.P., and Haase, V.H. (2008). The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ.* 15, 650–659.
- Kaye, S.B. (1998). New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *Br J Cancer* 78 Suppl 3, 1–7.
- Ke, Q., and Costa, M. (2006). Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 70, 1469–1480.
- Kim, W.Y., and Kaelin, W.G. (2004). Role of VHL gene mutation in human cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 4991–5004.
- Kirkali, Z., and Tuzel, E. (2003). Transitional cell carcinoma of the ureter and renal pelvis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 47, 155–169.
- Kosuri, K. V., Wu, X., Wang, L., Villalona-Calero, M.A., and Otterson, G.A. (2010). An epigenetic mechanism for capecitabine resistance in mesothelioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1465–1470.
- Lebbink, R.J., Lowe, M., Chan, T., Khine, H., Wang, X., and McManus, M.T. (2011). Polymerase II promoter strength determines efficacy of microrna adapted shRNAs. *PLoS One* 6.
- Lee, L.S., and Tan, M.-H. (2012). Predictive models for the practical management of renal



- cell carcinoma. *Nat. Rev. Urol.* 9, 73–84.
- Lee, S., Stewart, S., Nagtegaal, I., Luo, J., Wu, Y., Colditz, G., Medina, D., and Allred, D.C. (2012). Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer Res.* 72, 4574–4586.
- Li, Z. (2013). A new strategy of promoting cisplatin chemotherapeutic efficiency by targeting endoplasmic reticulum stress (Review). *Mol. Clin. Oncol.*
- Lobo, S.M., and Hernandez, N. (1989). A 7 bp mutation converts a human RNA polymerase II snRNA promoter into an RNA polymerase III promoter. *Cell* 58, 55–67.
- Luqmani, Y.A. (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med. Princ. Pract.* 14 Suppl 1, 35–48.
- Lushchak, V.I. (2012). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J. Amino Acids* 2012, 1–26.
- Maes, C., Carmeliet, G., and Schipani, E. (2012). Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 358–366.
- Mahamdallie, S.S., Hanks, S., Karlin, K.L., Zachariou, A., R Perdeaux, E., Ruark, E., Shaw, C.A., Renwick, A., Ramsay, E., Yost, S., et al. (2015). Mutations in the transcriptional repressor REST predispose to Wilms tumor. *Nat. Genet.* 47, 1471–1474.
- Manjunath, N., Wu, H., Subramanya, S., and Shankar, P. (2009). Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 732–745.
- Marieb, E.N., and Katja, H. (2015). *Anatomie et physiologie humaines* (Pearson Education, Inc).
- Martin-Rendon, E., Hale, S.J.M., Ryan, D., Baban, D., Forde, S.P., Roubelakis, M., Sweeney, D., Moukayed, M., Harris, A.L., Davies, K., et al. (2007). Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells* 25, 1003–1012.
- Maxwell, P.H., Wlesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.
- McMillin, D.W., Negri, J.M., and Mitsiades, C.S. (2013). The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 217–228.
- Van Meir, E. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours [2]. *Neurosurgery* 39, 878–879.
- Michiels, C. (2004). Physiological and Pathological Responses to Hypoxia. *Am. J. Pathol.* 164, 1875–1882.
- Mirjolet, J.F., Barberi-Heyob, M., Didelot, C., Peyrat, J.P., Abecassis, J., Millon, R., and Merlin, J.L. (2000). Bcl-2/Bax protein ratio predicts 5-fluorouracil sensitivity independently of p53 status. *Br. J. Cancer* 83, 1380–1386.
- Nissou, M.F., Brocard, J., El Atifi, M., Guttin, A., Andrieux, A., Berger, F., Issartel, J.P., and Wion, D. (2013). The transcriptomic response of mixed neuron-glia cell cultures to 1,25-dihydroxyvitamin D3 includes genes limiting the progression of neurodegenerative diseases. *J. Alzheimer's Dis.* 35, 553–564.
- Nitiss, J.L. (2009). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, 338–350.
- Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M.P., van Wingerden, K.E., Henzen-Logmans, S.C., Scheper, R.J., Flens, M.J., Klijn, J.G., Stoter, G., and Foekens, J.A. (1997). The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* 76, 486–493.



- O'Connor, K., and Chen, M. (2013). Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* 4, 141–147.
- Parker, W.B. (2009). Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer. *Chem. Rev.* 109, 2880–2893.
- Payne, S., and Miles, D. (2008). *Scott-Brown's Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*.
- Pestell, K.E., Hobbs, S.M., Titley, J.C., Kelland, L.R., and Walton, M.I. (2000). Effect of p53 status on sensitivity to platinum complexes in a human ovarian cancer cell line. *Mol. Pharmacol.* 57, 503–511.
- Pommier, Y. (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 6, 789–802.
- Pommier, Y. (2013). Drugging topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS Chem. Biol.* 8, 82–95.
- Pommier, Y., Sun, Y., Huang, S.N., and Nitiss, J.L. (2016). Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 703–721.
- Posadas, E.M., Limvorasak, S., Sharma, S., and Figlin, R. a (2013). Targeting angiogenesis in renal cell carcinoma. *Expert Opin. Pharmacother.* 14, 2221–2236.
- Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19, 1423–1437.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5675–5686.
- Razorenova, O. V., Finger, E.C., Colavitti, R., Chernikova, S.B., Boiko, A.D., Chan, C.K.F., Krieg, A., Bedogni, B., LaGory, E., Weissman, I.L., et al. (2011). *VHL* loss in renal cell carcinoma leads to up-regulation of CUB domain-containing protein 1 to stimulate PKC $\delta$ -driven migration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 1931–1936.
- Reles, A., Wen, W.H., Gee, C., Press, M.F., Reles, A., Schmider, A., Kilian, U., Minguillon, C., Schönborn, I., Lichtenegger, W., et al. (2001). Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 2984–2997.
- Riazalhosseini, Y., and Lathrop, M. (2016). Precision medicine from the renal cancer genome. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 655–666.
- Ring, A., and Dowsett, M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 643–658.
- Rini, B.I., and Atkins, M.B. (2009). Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 10, 992–1000.
- Ruan, K., Song, G., and Ouyang, G. (2009). Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J. Cell. Biochem.* 107, 1053–1062.
- Sampath, D., Rao, V.A., and Plunkett, W. (2003). Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 22, 9063–9074.
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat. Biotechnol.* 32, 347–350.
- Schägger, H., Brandt, U., Gencic, S., and von Jagow, G. (1995). Ubiquinol-Cytochrome-c Reductase from Human and Bovine Mitochondria. *Methods Enzymol.* 260, 82–96.
- Schödel, J., Grampp, S., Maher, E.R., Moch, H., Ratcliffe, P.J., Russo, P., and Mole, D.R. (2015). Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur. Urol.* 1–12.
- Schröder, A.R.W., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002).



- HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110, 521–529.
- Schwartz, G.K. (2005). *Combination Cancer Therapy: Modulators and Potentiators* (Humana Press).
- Selvakumar, T., Gjidoda, A., Hovde, S.L., and Henry, R.W. (2012). Regulation of human RNA polymerase III transcription by DNMT1 and DNMT3a DNA methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 287, 7039–7050.
- Semenza, G.L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 721–732.
- Semenza, G.L., and Wang, G.L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5447–5454.
- Siddik, Z. (2002). Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: DNA-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. *Cancer J.* 78, 156–162.
- Sobolewski, C., Cerella, C., Dicato, M., Ghibelli, L., and Diederich, M. (2010). The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Int. J. Cell Biol.* 2010, 1–21.
- Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., et al. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 487, 500–504.
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., et al. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4, e838.
- Sun, W., Qiu, G., Zou, Y., Cai, Z., Wang, P., Lin, X., and Huang, J. (2015). Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int J Clin Exp Pathol* 8, 12657–12667.
- Thibodeau, B.J., Fulton, M., Fortier, L.E., Geddes, T.J., Pruetz, B.L., Ahmed, S., Banes-Berceli, A., Zhang, P.L., Wilson, G.D., and Hafron, J. (2016). Characterization of clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 34, 168.e1-168.e9.
- Toffoli, S., and Michiels, C. (2008). Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *FEBS J.* 275, 2991–3002.
- Tortora, G.J., and Grabowski, S.R. (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie* (John Winkey & Sons, Inc.).
- Triller, N., Korosec, P., Kern, I., Kosnik, M., and Debeljak, A. (2006). Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naïve patients and in relapsed disease. *Lung Cancer* 54, 235–240.
- Tsai, Y.C., and Weissman, A.M. (2010). The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. *Genes Cancer* 1, 764–778.
- Un, F. (2007). G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers. *Anticancer. Drugs* 18, 411–417.
- Urquidi, V., Goodison, S., Cai, Y., Sun, Y., and Rosser, C.J. (2012). A candidate molecular biomarker panel for the detection of bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21, 2149–2158.
- Wang, D., and Lippard, S.J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 307–320.
- Wang, M., and Kaufman, R.J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 14, 581–597.

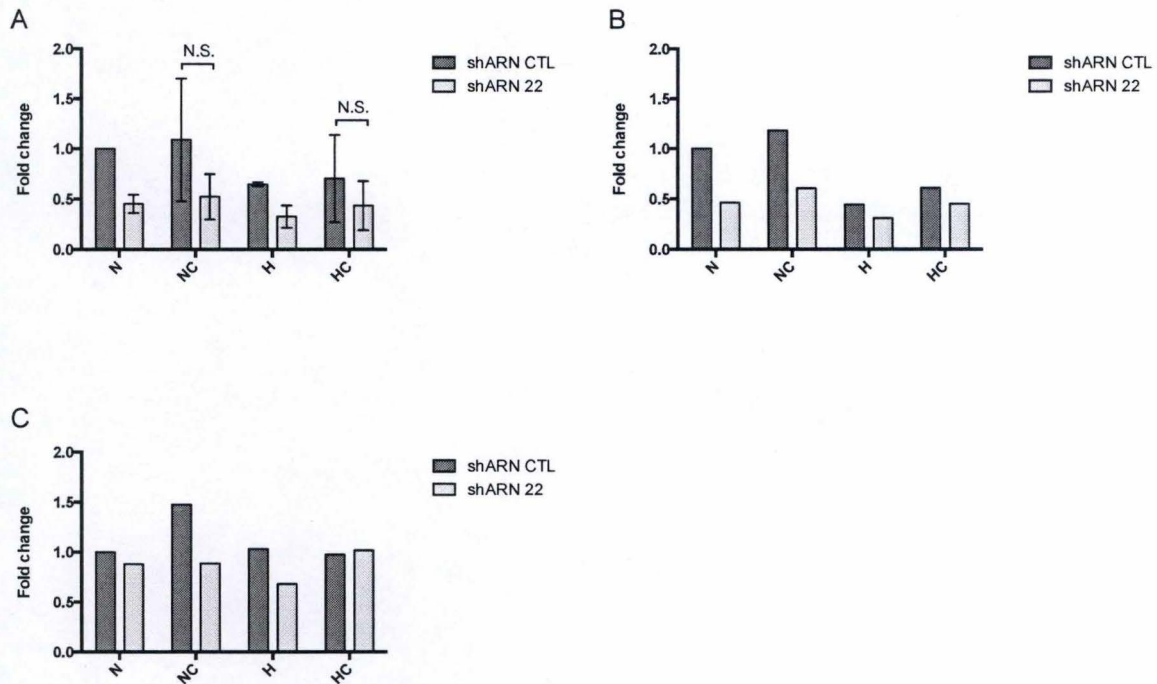


- Weber, G.F. (2015). *Molecular Therapies of Cancer* (Springer International Publishing).
- Weber, J.D., Hu, W., Jefcoat, S.C., Raben, D.M., and Baldassare, J.J. (1997). Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27(KIP1). *J. Biol. Chem.* 272, 32966–32971.
- Wettersten, H.I., Aboud, O.A., Lara, P.N., and Weiss, R.H. (2017). Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 410–419.
- Williams, C.S., Mann, M., and DuBois, R.N. (2000). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18, 7908–7916.
- Wrzesiński, T., Szelag, M., Cieřlikowski, W.A., Ida, A., Giles, R., Zdro, E., Szumska, J., Poźniak, J., Kwias, Z., Bluysen, H.A.R., et al. (2015). Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer* 15, 518.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–939.
- Zalcberg, J., Hu, X.F., Slater, A., Parisot, J., El-Osta, S., Kantharidis, P., Chou, S.T., and Parkin, J.D. (2000). MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 3, 66–75.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V. V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity. *Cancer Cell* 11, 407–420.
- Zhou, J., and Giannakakou, P. (2005). Targeting Microtubules for Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem. -Anti-Cancer Agents* 5, 65–71.
- Zuckerbraun, B.S., Shapiro, R.A., Billiar, T.R., and Tzeng, E. (2003). RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation* 108, 876–881.



## VI. ANNEXES





**Annexe 1 : Analyse de l'expression du gène PolDIP2 dans les cellules RCC4 plus pVHL**

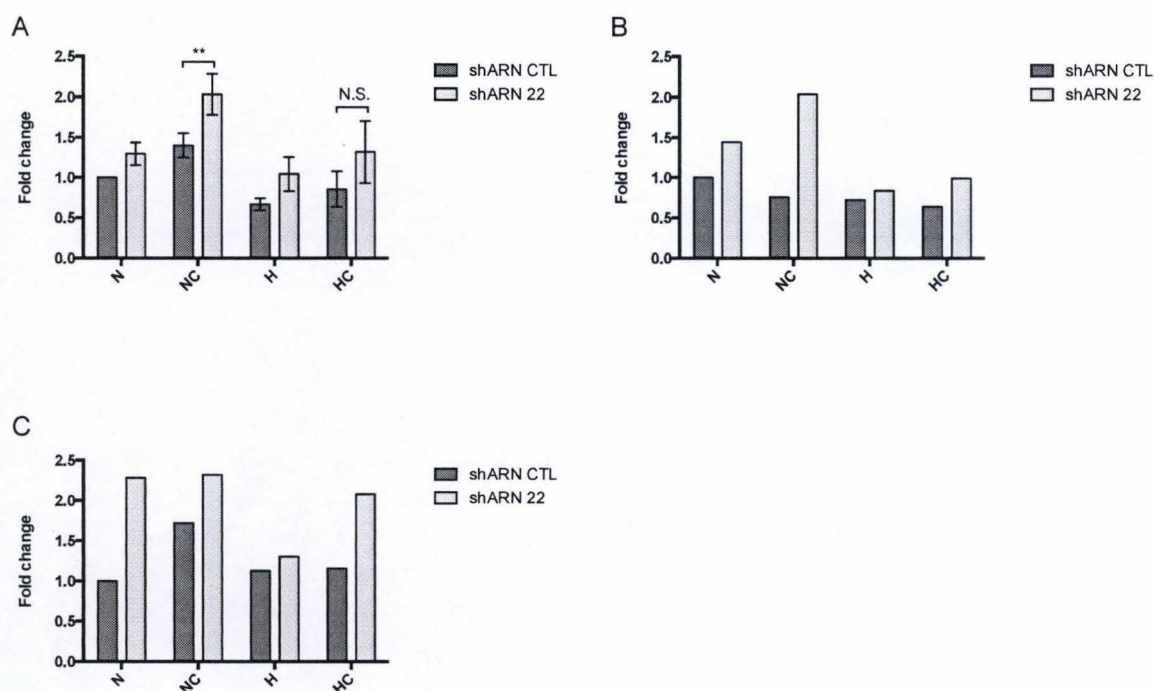
Les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) ont été incubées en normoxie (N) ou hypoxie (H) pendant 48 heures et l'ARN total a été extrait, puis rétro-transcrit en ADNc. L'abondance relative de l'ARNm TMEM45A a été quantifiée par RT-qPCR en utilisant 23 kDa comme gène de référence, aux passages post-transduction précoce (A), intermédiaire (B) et tardif (C). Les résultats sont exprimés en fold change après normalisation à la condition de référence (shARN CTL, N). Pour le PPT précoce (A), les résultats proviennent de trois réplicats biologiques indépendants et sont analysés statistiquement par une ANOVA 2.

\* shARN 22 vs shARN CTL correspondant

\*  $p < 0,005$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

N.S. = non significatif





**Annexe 2 : Analyse de l'expression du gène UQCR10 dans les cellules RCC4 plus pVHL.**

Les cellules transduites avec le shARN ne ciblant aucune séquence (shARN CTL) ou le shARN ciblant l'ARNm de TMEM45A (shARN 22) ont été incubées en normoxie (N) ou hypoxie (H) pendant 48 heures et l'ARN total a été extrait, puis rétro-transcrit en ADNc. L'abondance relative de l'ARNm TMEM45A a été quantifiée par RT-qPCR en utilisant 23 kDa comme gène de référence, aux passages post-transduction précoce (A), intermédiaire (B) et tardif (C). Les résultats sont exprimés en fold change après normalisation à la condition de référence (shARN CTL, N). Pour le PPT précoce (A), les résultats proviennent de trois réplicats biologiques indépendants et sont analysés statistiquement par une ANOVA 2.

\* shARN 22 vs shARN CTL correspondant

\*  $p < 0,005$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$

N.S. = non significatif